

UNIVERSITE DU QUEBEC

**Thèse
présentée à
l' Université du Québec à Trois-Rivières**

**Comme exigence partielle
pour l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Biophysique)**

par

Sylvain Robert

Baccalauréat ès Sciences (Chimie, UQTR)

**Transferts d'électrons entre la
chlorophylle a et la plastoquinone-9
incorporées dans des membranes
planaires asymétriques**

Août 1987

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

A Andrée

Dans l'immensité de l'espace et l'éternité du temps,
c'est une grande joie que de partager
une planète et une époque avec Andrée.

RESUME

Le but de ce travail est d'étudier les réactions de transfert d'électron entre la chlorophylle a (Chl a) et la plastoquinone-9 (PQ-9) incorporées à l'intérieur d'une structure organisée, la bicouche lipidique, en fonction des paramètres suivants : la charge de surface, l'influence de contre-ions dans la sous-phase et l'asymétrie d'incorporation. Etant donné que les membranes naturelles possèdent un très haut degré d'asymétrie, nous avons utilisé la technique de reconstitution de Müller-Montal, la seule à permettre de reconstituer des bicouche planes asymétriques. Nous avons effectué des mesures de spectroscopie de fluorescence de la Chl a incorporée à l'intérieur de bicouches. Concomitamment à cela, nous avons aussi mesuré les propriétés de conductance et de capacitance membranaire des bicouches et nous avons été à même de mesurer des transferts d'électrons. L'analyse de ces résultats nous a permis de tirer des conclusions quant à l'influence que les facteurs précédemment mentionnés ont sur l'efficacité de transfert d'électron entre la Chl a et la PQ-9.

Nos mesures spectroscopiques et nos mesures de capacitance membranaire nous ont montré que la Chl a est incorporée dans les bicouches lipidiques sous forme de monomères, et que celle-ci se retrouve associée à l'intérieur de microdomaines comprenant majoritairement de la Chl a. La Chl a est incorporée dans la bicouche avec la chaîne phytyle servant d'ancre à l'intérieur de la bicouche, au niveau des chaînes aliphatiques des lipides. La tête porphyrique est incorporée au niveau des têtes polaires des lipides. La PQ-9 se situe dans le plan de la bicouche, au centre de cette dernière. Il appert que la tête quinone de la PQ-9 se positionne de façon à combler le "manque" créé dans la bicouche par la position de la Chl a.

Par ailleurs, nos mesures de conductance et de capacitance membranaire nous ont montré qu'il est possible d'obtenir des réactions de transfert d'électron entre la Chl a et la PQ-9 incorporées asymétriquement dans les bicouches lipidiques. De plus, nous avons constaté que l'intensité de ces transferts d'électrons est dépendante de l'orientation du champ électrique créé par l'asymétrie lipidique. A la suite de ces réactions de transfert d'électron, il se produit une perturbation permanente du milieu diélectrique de la bicouche, modification qui n'est pas influencée par la présence de charges de surface. Cette modification du milieu diélectrique s'explique par le transfert d'un électron entre la Chl a et la PQ-9 qui s'effectue par mécanisme de collisions; les positions de la Chl a et de la PQ-9 à l'intérieur de la bicouche se prêtant bien à un tel mécanisme. Ce mécanisme induirait la formation d'un complexe $\text{Chl}^+/\text{PQ-9}^-$, pouvant mener à la formation d'une paire radicalaire $\text{Chl}^{+\cdot}/\text{PQ-9}^{\cdot-}$ stable dont les propriétés modifient ainsi les conditions diélectriques de la bicouche lipidique. Aussi, nos mesures de fluorescence nous ont montré que le rendement quantique de fluorescence de la Chl a est très faible et qu'il n'est pas relié aux propriétés de transfert d'électron. Nous en avons conclu que le processus non-radiatif de désactivation thermique est le plus important processus de désactivation présenté par la chlorophylle a lors de nos expériences.

Nos résultats nous ont amené à conclure que l'hypothèse de Hol (1985), concernant l'importance de l'orientation du dipôle associé aux hélices- α des chaînes polypeptidiques, sur l'efficacité de transfert d'électron à l'intérieur des centres réactionnels est probablement juste. Ce serait la position relative du donneur et de l'accepteur d'électron à l'intérieur des centres réactionnels qui serait responsable de la grande efficacité du processus photosynthétique.

AVANT-PROPOS

Je tiens à remercier mon directeur de projet, le docteur Pierre Tancrède pour toute l'attention et le support inestimable qu'il a su m'apporter tout au long de ce travail. Il a été plus qu'un directeur, il est surtout devenu un véritable ami: merci Pierre!

Je tiens aussi à remercier les autres personnes qui, de près ou de loin, ont collaboré à l'élaboration de ce travail et dont l'aide au laboratoire m'a été précieuse. Plus spécialement, je voudrais remercier Marc Brullemans et Jean-Pierre Richard, merci les gars.

TABLE DES MATIERES

Résumé	i
Avant-propos	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux	v
Liste des figures	vi
Liste des symboles et abréviations	viii
Chapitre 1. <u>Introduction</u>	1
1.1. Etude des systèmes <i>in vivo</i>	1
1.1.1. Photosynthèse	1
1.1.2. Organisation de l'appareil photosynthétique	2
1.1.3. Transfert d'électron dans les milieux organisés naturels	6
1.2. Etude des systèmes modèles	9
1.2.1. Méthode de Langmuir-Blodgett	9
1.2.2. Méthode des vésicules unilamellaires	10
1.2.3. Méthode des films noirs, BLM	12
1.2.4. Comparaisons, avantages, inconvénients	14
1.2.5. L'asymétrie membranaire	17
1.2.6. Nouvelle approche: méthode de Müller-Montal	17
1.3. But du travail et moyens utilisés	23
Chapitre 2. <u>Matériel et méthode</u>	24
2.1. Montage expérimental	24
2.1.1. Bain de reconstitution membranaire	24
2.1.2. Appareillage optique	29
2.1.2.1. Excitation	29
2.1.2.2. Détection	30
2.1.3. Interface informatique	33
2.1.3.1. Appareillage	33
2.1.3.2. Programmation	33

2.1.4.	Mesure des propriétés électriques	34
2.1.4.1	Circuit équivalent d'une bicouche	34
2.1.4.2.	Capacitance	37
2.1.4.3.	Résistance	40
2.2.	Reconstitution membranaire	43
2.2.1.	Produits utilisés pour les bicouches	43
2.2.1.1.	Produits utilisés	43
2.2.1.2.	Traitement, conservation	47
2.2.1.3.	Purification, identification	48
2.2.2.	Sous-phases	49
2.3.	Méthodologie	50
2.3.1.	Expérience type	50
2.3.2.	Résultats types	51
Chapitre 3.	<u>Résultats et Discussion</u>	54
3.1.	Caractéristiques de stabilité et de reproductibilité des bicouches lipidiques	54
3.2.	Etude en fonction du rapport lipide/chlorophylle <u>a</u>	57
3.2.1.	Propriétés de fluorescence de la Chl <u>a</u> dans les bicouches	57
3.2.2.	Propriétés électriques des bicouches	64
3.2.3.	Capacitance membranaire et incorporation de la PQ-9	71
3.3.	Etude en fonction de la charge de surface	75
3.3.1.	Utilisation de lipides chargés	76
3.3.1.1.	Etude des propriétés spectroscopiques de la Chl <u>a</u> incorporée dans des matrices lipidiques chargées	79
3.3.1.2.	Etude des propriétés électriques reliées au transfert d'électron chlorophylle-quinone dans les matrices lipidiques chargées	83
3.3.2.	Neutralisation des charges de surface à l'aide d'ions Ca^{++}	98
Chapitre 4.	<u>Conclusion</u>	102
Bibliographie		106
Annexe	<u>Programmes informatiques</u>	114

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Epaisseurs mesurées pour des bicouches lipidiques	72
Tableau 2.	Reconstitution membranaire: systèmes utilisés	78
Tableau 3.	Variation de S_{sp} en fonction de la charge de surface	88

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Détail de l'organisation d'une feuille	3
Figure 2.	Vue écorchée d'un chloroplaste	4
Figure 3.	Membrane d'un thylakoïde	5
Figure 4.	Diagramme de formation d'une bicouche	19 20
Figure 5.	Schéma du montage expérimental	25
Figure 6.	Vue en perspective du double-bain	26
Figure 7.	Détail du double-bain	28
Figure 8.	Poinçon à matrice	29
Figure 9.	Calibration du système de détection optique	31
Figure 10.	Support de fibre optique	32
Figure 11.	Circuit équivalent du système film-membrane	35
Figure 12.	Circuit capacitif équivalent du système film-membrane	36
Figure 13.	Circuit résistif équivalent du système film-membrane	37
Figure 14.	Circuit de mesure de capacitance	38
Figure 15.	Calibration du circuit de capacitance	40
Figure 16.	Circuit de mesure de résistance	41
Figure 17.	Calibration du circuit de résistance	42
Figure 18.	Structure des phospholipides	44
Figure 19.	Structure de la chlorophylle <i>a</i>	45
Figure 20.	Structure de la plastoquinone-9	46

Figure 21.	Enregistrement typique d'une mesure de résistance	52
Figure 22.	Spectre de fluorescence typique	53
Figure 23.	Modèle d'incorporation de la Chl <u>a</u> dans une bicouche lipidique selon Anderson (1975a, 1975b)	62
Figure 24.	Modèle d'incorporation de la Chl <u>a</u> dans une bicouche lipidique selon Brasseur <u>et coll.</u> (1984)	63
Figure 25.	Variation de la résistance spécifique en fonction du rapport lipide/chlorophylle	66
Figure 26.	Variation de la capacitance spécifique en fonction du rapport lipide/chlorophylle	69
Figure 27.	Modèle d'incorporation de la Chl <u>a</u> et de la PQ-9 dans les bicouches lipidiques	75
Figure 28.	Position du maximum de fluorescence en fonction de la charge de surface	80
Figure 29.	Variation de la conductance spécifique en fonction de la charge de surface	84
Figure 30.	Variation de la capacitance spécifique en fonction de la charge de surface	90

LISTE DES SYMBOLES ET ABREVIATIONS

BChl <u>a</u>	Bactériochlorophylle <u>a</u>
BLM	Black Lipid Membrane, film noir
Chl <u>a</u>	Chlorophylle <u>a</u>
Chl*	Chlorophylle <u>a</u> excitée
Chl*/PQ-9	Complexe chlorophylle <u>a</u> excitée/plastoquinone-9
C_f	Capacitance du film de Téflon
C_{fm}	Capacitance totale du film de Téflon et de la membrane
C_m	Capacitance de la membrane
C_{sp}	Capacitance spécifique
d_{bic}	Epaisseur diélectrique de la bicouche
DMDSAm	Bromure de diméthyl-distéaryl-ammonium
PE	Phosphatidyléthanolamine
PQ-9	Plastoquinone-9
PS	Phosphatidylsérine
R_f	Résistance du film de Téflon
R_{fm}	Résistance totale du film de Téflon et de la membrane
R_m	Résistance de la membrane
R_{sp}	Résistance spécifique
ϵ	Constante diélectrique
χ	Moyenne
σ	Déviati on standard
Φ	Rendement quantique

Chapitre 1. Introduction

Section 1.1. Etude des systèmes *in vivo*

1.1.1. Photosynthèse

La photosynthèse est un processus d'une extrême importance, dont la vie telle que nous la connaissons sur terre est tributaire. A partir d'eau et de gaz carbonique, la synthèse de matière organique est effectuée par l'intermédiaire de la lumière avec comme sous-produit la libération d'oxygène, dont l'importance n'est guère discutable.

Beaucoup d'études ont été effectuées au cours des dernières années sur la photosynthèse et sur les différentes réactions photochimiques qui se produisent durant ce processus. En effet, pour pouvoir mimer le plus fidèlement possible la nature et employer l'énergie solaire efficacement, il convient d'étudier de plus près le processus photosynthétique. L'exploration de quelques applications potentiellement pratiques dans ce domaine a été grandement facilitée par l'identification de caractéristiques communes que l'on retrouve dans les différents "centres réactionnels de la photosynthèse", allant des plantes évoluées aux bactéries, en passant par les algues. Ces caractéristiques englobent l'absorption de la lumière par une "antenne" constituée de chlorophylle a et d'autres pigments (e.g. chlorophylle b , caroténoïdes), le transfert d'excitation à un centre réactionnel proprement dit, ou piège d'énergie, et l'initiation de réactions de transferts d'électrons. Tout ceci est effectué avec une grande efficacité et extrêmement rapidement. En effet, la réaction de séparation de charges qui a lieu à l'intérieur du centre réactionnel se produit en seulement quelques picosecondes (Sauer, (1979),

Bolton et Hall, (1979), Clayton, (1980), Katz et Hindman, (1981)). Le processus, depuis l'arrivée du photon jusqu'à la séparation de charges, ne nécessite au total que 2 ns (Clayton, (1980), Robertson, (1983)). Le transfert d'électrons se poursuit avec d'autres molécules à l'intérieur d'une chaîne de transporteurs (plastoquinones, cytochromes, plastocyanine, ferrédoxine) avec des temps de plus de 100 μ s pour chaque réaction (Popovic et coll., (1986b)).

Il convient ici de préciser le cheminement que suivra le présent travail. Tout d'abord, nous survolerons brièvement les renseignements disponibles sur l'organisation de l'appareil photosynthétique, puis, nous observerons plus attentivement les concepts de transferts d'électrons dans les milieux organisés. Ensuite, une revue détaillée des expériences qui ont été tentées avec les différents systèmes modèles appliqués aux processus de transferts d'électrons sera présentée ainsi que les conclusions que l'on peut en tirer. A cela s'ajoutera une discussion sur les avantages et inconvénients des différentes approches utilisées. Nous présenterons, par la suite, notre approche personnelle au problème de reconstitution membranaire, que nous appliquerons aux problèmes de transferts d'électrons.

1.1.2. Organisation de l'appareil photosynthétique

Chez les végétaux supérieurs, le siège de la photosynthèse est situé dans les feuilles dont nous pouvons voir une coupe à la figure 1. On peut y voir l'organisation stratifiée d'une feuille. On y retrouve divers groupes de cellules, chacune ayant une fonction spéciale (e.g. les cellules épidermiques qui jouent un rôle de protection, les cellules de garde dont la fonction est de contrôler l'ouverture et la fermeture des stomates pour régulariser les échanges gazeux et le taux d'humidité à l'intérieur de la feuille, et les cellules du tissu palissadique et du tissu spongieux où s'effectue la photosynthèse).

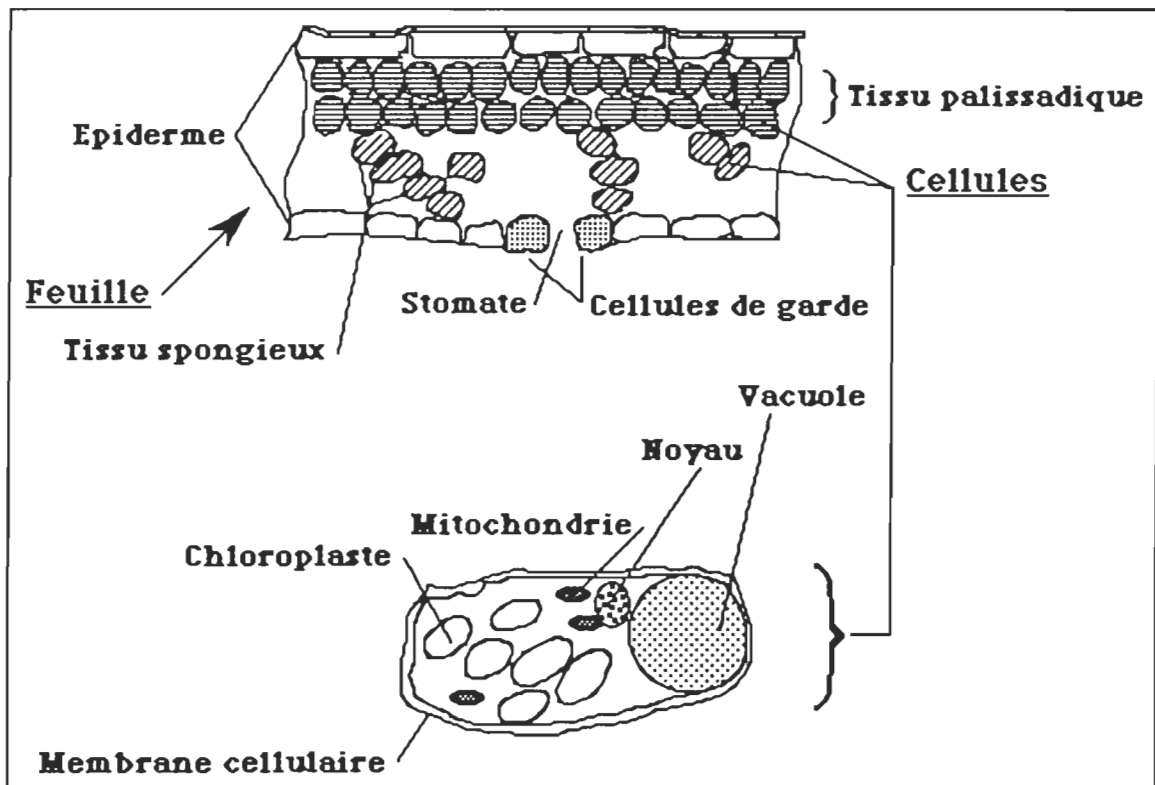


Figure 1. Détail de l'organisation d'une feuille

Ces cellules végétales sont elles-mêmes constituées de plusieurs sous-unités structurales dont l'activité est essentielle pour les maintenir vivantes (e.g. les mitochondries, qui sont des convertisseurs d'ATP, le noyau qui renferme l'information génétique, les vacuoles qui accumulent des substances nutritives). Une de ces unités structurales importantes, au point de vue de la photosynthèse, que l'on retrouve dans une cellule végétale est le chloroplaste. Le chloroplaste est lui-même constitué de plusieurs disques empilés les uns sur les autres, interreliés et baignant dans un milieu aqueux, le stroma.

Nous pouvons voir à la figure 2 une représentation schématique de cette

organisation. Ces disques portent le nom de thylakoïdes et sont le siège de l'activité photosynthétique. Il existe aussi des thylakoïdes qui sont reliés à la membrane interne du chloroplaste et qui n'ont pas la forme d'un disque. Les premiers sont appelés thylakoïdes granaires et les second thylakoïdes stromatiques.

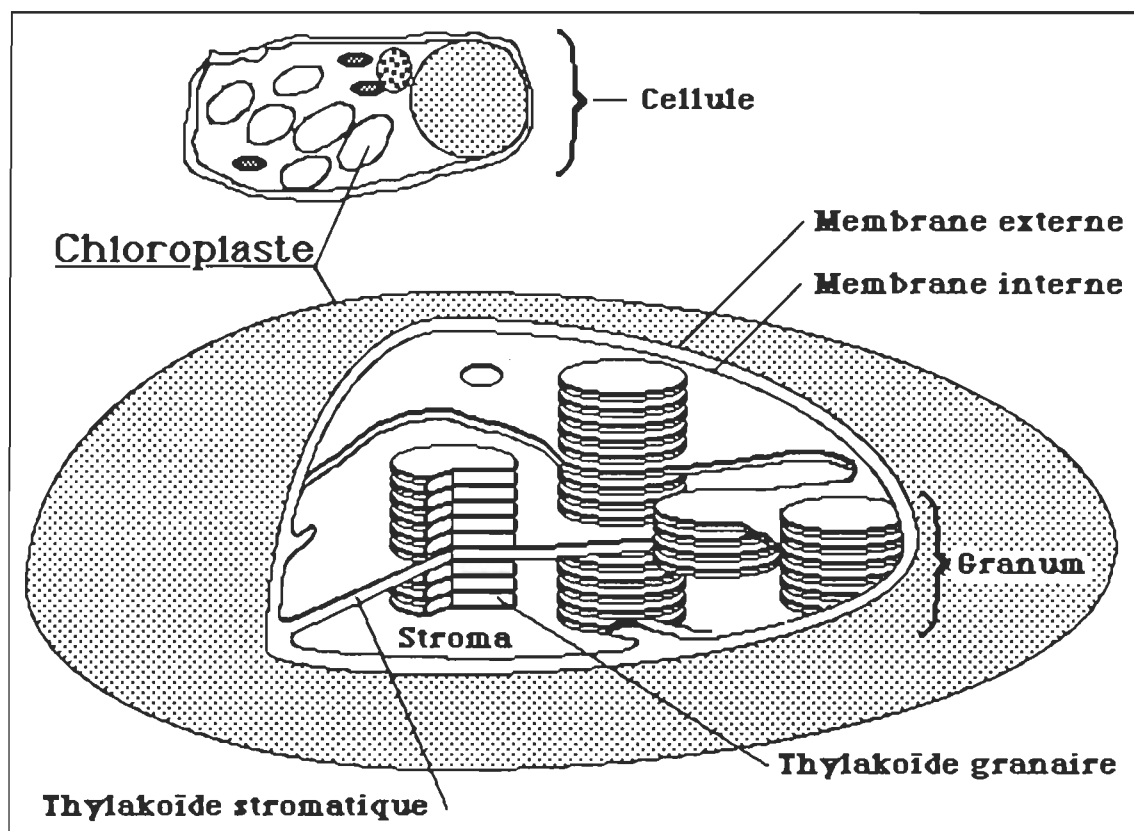


Figure 2. Vue écorchée d'un chloroplaste

La figure 3 présente par ailleurs la structure de la paroi d'un thylakoïde. Cette paroi est constituée essentiellement d'une bicouche lipidique, en accord avec le modèle membranaire généralisé de Singer et Nicholson (mosaïque fluide). On peut y voir que la membrane est composée de protéines, transmem-

branaires et/ou de surface, baignant dans une matrice lipidique. Cette "bicouche" contient tout le matériel nécessaire pour effectuer la transduction d'énergie lumineuse en énergie chimique.

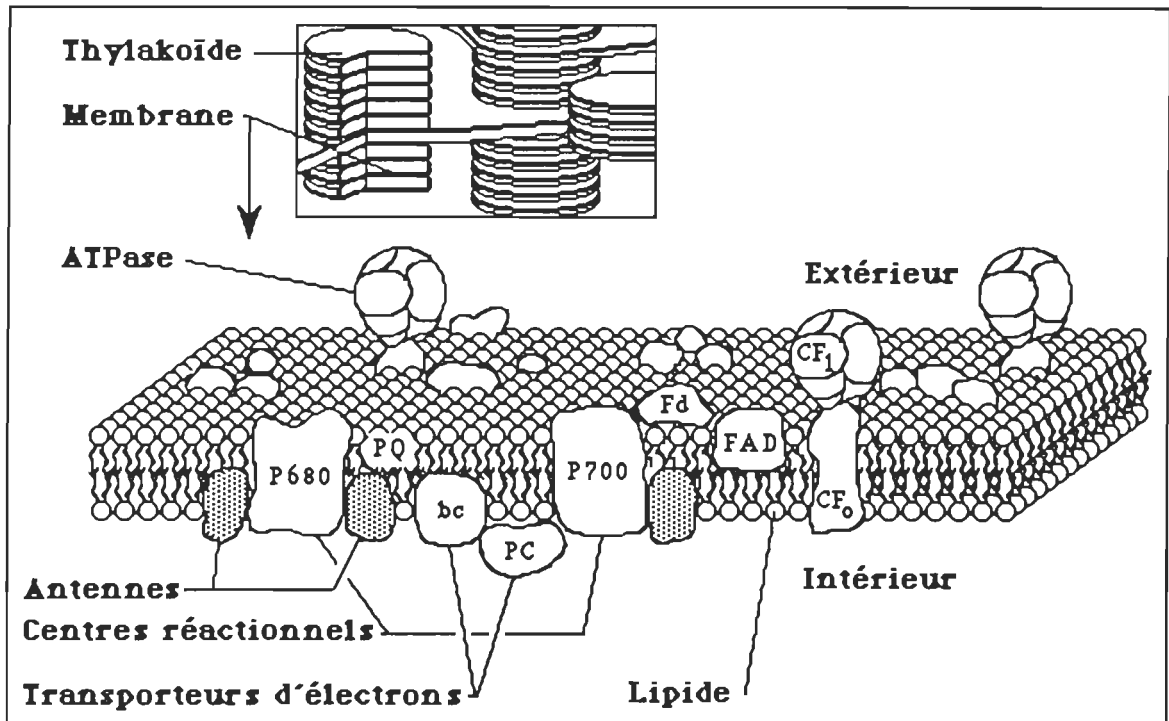


Figure 3. Membrane d'un thylakoïde

Il existe, dans cette membrane, des complexes pigments-protéines qui servent d'antennes pour capter la lumière, des centres réactionnels vers lesquels l'énergie est dirigée (P680 et P700) et une chaîne de transporteurs d'électrons qui sont responsables des différentes réactions redox qui se produisent dans ce milieu (tel les plastoquinones (PQ), les cytochromes (*bc*), la plastocyanine (PC), la ferrédoxine (Fd), la Flavine Adénine Dinucléotide (FAD) et une ATPase (CF₁-CF₀)). Les différents complexes protéiques ainsi que les lipides membranaires

possèdent tous une grande importance et jouent, chacun, un rôle particulier tant dans l'organisation structurale du thylakoïde, que dans le processus photosynthétique lui-même. Il n'est pas dans notre propos ici de discuter en détail du rôle particulier joué par chacun de ces constituants. Le lecteur pourra à profit consulter la documentation scientifique à ce sujet (e.g. Olson, (1980), Murphy, (1982), Gounaris et coll., (1983), Murphy et Woodrow, (1983), Quinn et Williams, (1983), Murphy, (1986)). Nous nous intéressons plutôt, dans le cadre spécifique de ce travail, au problème du transfert d'électrons dans les systèmes naturels et, en particulier, dans les membranes des thylakoïdes.

1.1.3. Transferts d'électrons dans les milieux organisés naturels

Les processus de transfert d'électron sont présents lors de plusieurs cycles d'activités biochimiques: production d'ATP, propulsion du flagelle d'*E. coli*, processus visuel, processus photosynthétique, etc. Pour maintenir une grande efficacité lors de ces processus, il importe de pouvoir obtenir une séparation de charges efficace en empêchant que les produits de réaction ne se recombinent entre eux. Une façon efficace d'éviter un tel état de fait est de séparer, à l'aide d'une barrière, les produits de réaction. C'est probablement pourquoi les processus que nous venons de mentionner se produisent tous à l'intérieur d'un milieu organisé, dans ce cas une bicouche lipidique. En plus d'éviter une recombinaison gênante des produits de réaction, l'utilisation d'un milieu organisé, comme une bicouche lipidique, permet d'obtenir une meilleure orientation des réactifs entre eux et augmente les facteurs aidant à une séparation de charges efficace (orientation de champ électrique, des charges de surface, des molécules entre elles, etc.). Un meilleur arrangement des réactifs entre eux, une séparation des réactifs: deux facteurs importants que l'organisation structurée d'un milieu peut apporter à une séparation de charges efficace.

Le processus photosynthétique, quant à lui, étonne par la grande efficacité de conversion dont il fait preuve. En effet, la somme des réactions redox qui œuvrent tout le long de la chaîne de transporteurs d'électrons, située dans la membrane du thylakoïde, va optimalement fournir un potentiel de 1,28 eV, et ce, pour une énergie minimale de 3,6 eV apportée par les photons incidents (Gerischer (1980)). Ceci représente une efficacité de conversion de 35%, ce qui est énorme lorsqu'on la compare, par exemple, avec le rendement de conversion que l'on obtient avec les moteurs à combustion et qui est de l'ordre de 25%.

Il est aussi remarquable de noter que les chaînes de transport d'électron que l'on retrouve, entre autres, dans les mitochondries, les chloroplastes et les bactéries photosynthétiques, portent des ressemblances. En effet, toutes contiennent des complexes multiprotéiques, les cytochromes **bc**, et des quinones (Rich, (1984)). Le fait que ces molécules et complexes se retrouvent à plusieurs endroits, jouent toujours le même rôle et sont toujours situés dans des milieux organisés ne peut être le fruit du hasard.

Prenons le cas des bactéries photosynthétiques, tel ***Rhodopseudomonas sphæroïdes***. Il a été démontré, à l'aide d'études sur des films de type Langmuir-Blodgett, que dans les centres réactionnels, l'orientation du champ électrique externe est d'une importance primordiale au niveau du processus de séparation des charges. Si le champ est aligné de façon à s'opposer au transfert d'électrons, il peut empêcher qu'une séparation de charges ne se produise (Tiede et coll., (1982)). De plus, il est primordial de retrouver tout près du centre réactionnel une quinone qui acceptera un électron provenant de la bactériochlorophylle **a**, sinon il y aura recombinaison des charges. L'organisation spatiale des constituants, que seul un milieu organisé peut apporter, constitue donc ici le facteur déterminant du mécanisme de séparation de charges.

Récemment, des études en diffraction des rayons-x ont apporté un peu plus de lumière sur la structure interne des centres réactionnels de *Rhodospseudomonas viridis* (Deisenhofer et coll. (1985a, 1985b), Michel et coll., (1986), et Allen et coll., (1986)). Dans ces centres réactionnels, les deux chaînes polypeptidiques les plus près du donneur d'électron (ici, une paire de bactériochlorophylle a) sont positionnées de telle sorte que l'orientation du moment dipolaire des hélices- α favorise le transfert d'électron entre le donneur et l'accepteur d'électron (une ubiquinone). A ce propos, Hol (1985) a récemment proposé que le moment dipolaire des hélices- α , qui composent la partie centrale des protéines transmembranaires, influence de façon importante les processus de transferts d'électrons.

Dans le cas particulier des membranes des chloroplastes, il a été démontré, par des études en résonance paramagnétique électronique (ESR), que la chlorophylle a et les quinones (ici, benzoquinones, ubiquinones, naphthoquinones) forment, en solution, des complexes de transfert de charge très stables, dont le rendement de transfert est hautement efficace (Maruyama et coll., (1982)). Il a été suggéré que la "formation d'un complexe" entre la chlorophylle et une quinone, plus exactement la plastoquinone-9, serait importante pour les processus de transferts d'électrons *in vivo* (Millner et Barber (1984)). Ces études suggèrent que l'atome central de magnésium que l'on retrouve dans la chlorophylle a contribuerait au transfert d'électrons en formant des complexes avec les accepteurs d'électrons dans les centres réactionnels. De plus, il est démontré que la plastoquinone-9 serait ancrée profondément au cœur de la bicouche, près du plan central (Katsikas et Quinn, (1981), Alonso et coll., (1981), Maggio et coll., Quinn et Esfahani, (1980), Spisni et coll. (1978), Kingsley et Feigenson, (1981)). A la lumière de ces faits, on ne doit pas douter de l'importance de la plastoquinone-9 en ce qui a trait aux premières étapes de transfert d'électrons suivant la séparation

de charges (Murphy, (1984), Rich, (1984)), ni de l'importance d'avoir un milieu organisé qui optimise les conditions de séparation de charges.

Section 1.2. Etude des systèmes modèles

Pour pouvoir étudier les phénomènes de transfert de charges à l'intérieur du processus photosynthétique et contrôler aisément différents paramètres, particulièrement dans le but de comprendre comment ces paramètres modulent l'efficacité du transfert d'excitation, il est utile de travailler sur des systèmes modèles. Sont présentés ici trois systèmes modèles couramment utilisés. Nous présenterons les résultats dignes de mention que chaque méthode a permis de découvrir. Suivra ensuite une comparaison de ces méthodes et l'exposition de la technique que nous entendons utiliser et des buts que nous nous sommes fixés pour cette étude.

1.2.1. Méthode de Langmuir-Blodgett

La méthode consiste à déposer sur un support solide (lamelle de verre, de quartz, de SnO_2) une succession de couches d'épaisseur monomoléculaire à l'aide d'un bain de Langmuir en faisant lentement entrer, puis ressortir, le support (Kuhn et coll., (1972), Rothen, (1968)). Ces multicouches contiennent les pigments (antennes, donneurs, accepteurs) que l'on veut étudier.

Dans le cadre du travail qui nous intéresse, i.e. les transferts d'électrons dans les milieux organisés, les résultats les plus marquants sont ceux obtenus par le groupe de P.L. Dutton (Tiede, (1986), Popovic et coll., (1986a), Popovic et coll., (1986b)). Ces auteurs ont montré que dans les centres réactionnels de *Rhodospseudomonas sphæroïdes*, une bactérie photosynthétique, les réponses

électriques obtenues après illumination sont plus importantes lorsque le donneur d'électron (le dimère de bactériochlorophylle, $(BChl)_2$) est situé du côté négatif d'un champ appliqué sur le film alors que l'accepteur, la quinone, est situé du côté positif de ce même champ. Dans ces conditions, le rendement quantique de séparation de charges approche l'unité. Lorsque la situation est inversée, i.e. lorsque le dimère $(BChl)_2$ est situé du côté positif du champ et que la quinone est située du côté négatif du champ, les photoréponses approchent zéro, et les rendements quantiques de séparation de charges diminuent beaucoup. Selon ces auteurs, l'orientation d'un champ électrique externe est un critère primordial en ce qui concerne l'efficacité de séparation de charges, première étape d'un mécanisme de transfert d'électron.

1.2.2. Méthode des vésicules unilamellaires

Cette méthode consiste à permettre à des produits amphiphiles de s'organiser en bicouche lipidique grâce aux interactions moléculaires possibles entre ces molécules et l'eau (Sackmann, (1983)). Cet arrangement est spontané pour certaines molécules amphiphiles. La vésicule possède une structure sphérique avec deux surfaces, interne et externe. Il est à noter que le compartiment interne n'est accessible qu'au moment de la formation de la vésicule et en aucun autre temps.

En 1981, Runquist et Loach ont démontré, à l'aide de vésicules, que l'on peut utiliser des porphyrines (protoporphyrine, $Fe(II)$ -tétraphénylporphyrine, $Ni(II)$ -tétraphénylporphyrine) comme catalyseurs de transport d'électrons. Dans ces expériences, la porphyrine accapare un électron provenant d'un donneur (acide indigotétrasilphonique) situé d'un côté de la bicouche et, après avoir migré de

part en part de cette bicouche, le cédera à un accepteur ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) situé de l'autre côté. La porphyrine revient à son point de départ et le cycle se répète jusqu'à neutralisation complète du couple rédox. Les meilleurs rendements ont été obtenus avec les métalloporphyrines, ce qui suggère que la présence d'un atome métallique au centre de la porphyrine facilite de beaucoup les différentes réactions de transferts d'électrons.

Par ailleurs, Fang et Tollin, (1983) de même que Ford et Tollin, (1983) ont réalisé des expériences intéressantes en utilisant la chlorophylle a comme photosensibilisateur entre la glutathione, ou le EDTA, servant de donneur et une naphtoquinone, ou le méthyl viologène, servant d'accepteur. Ils ont aussi expérimenté en utilisant la chlorophylle a comme donneur et la p-benzoquinone comme accepteur. Ces chercheurs ont démontré que pour moduler les processus de recombinaison de charges, on peut incorporer une charge électrique nette près du site de transfert d'électrons. Cette charge repoussera alors l'ion radicalaire de même signe avant sa recombinaison avec l'ion de signe opposé. Un choix approprié de charges de surface permettra donc d'influencer directement la recombinaison des charges. La présence de contre-ions dans la phase aqueuse sera importante car elle pourra neutraliser, totalement ou partiellement, l'excès de charges à la surface de la vésicule. Ceci influencera d'autant le champ électrostatique perçu par les molécules incorporées dans la bicouche. Les résultats suivants sont décrits en comparaison avec des expériences similaires effectuées sans l'utilisation de surfactants chargés. Il est démontré [1] qu'il est possible de produire de grands effets sur la cinétique et le mécanisme de décomposition radicalaire d'un système chlorophylle-quinone, en vésicules, en incorporant de petites quantités (20%) de surfactant négativement chargés. [2] Ceci causera l'expulsion de l'accepteur, de même charge, hors de la bicouche vers l'interface. [3] L'incorporation de surfactant positivement chargé (20%), diminue le taux de

production d'ions radicalaires, et [4] élimine presque totalement la recombinaison des charges au travers de l'interface bicouche-eau.

Fang et Tollin, (1984) ont aussi démontré l'effet des contre-ions (K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+}) sur le transfert d'électron entre la chlorophylle a et la p-benzoquinone dans des vésicules chargées (négativement à l'aide du dihexadécylphosphate, et positivement à l'aide de didodécyldiméthylammonium). Il s'est avéré possible de réguler les effets précédemment observés à l'aide des contre-ions qui neutralisent alors partiellement ou totalement les charges de surface des vésicules chargées.

Puis, en 1985, Senthilathipan et Tollin, à l'aide d'études de transfert entre la chlorophylle a et des quinones sulfonées ou du méthyl viologène, ont vérifié que les effets de pH (de 5,0 à 7,0) sont de beaucoup plus faibles que les effets de force ionique. S'il n'y a pas de surfactant chargé dans les vésicules, ou si les vésicules ne contiennent que des surfactants positivement chargés (jusqu'à 30%), la chlorophylle subit moins de photodégradation que celle que l'on retrouve dans des vésicules contenant des lipides négativement chargés. Il y a, de plus, une augmentation marquée de l'efficacité de séparation de charges lorsque l'accepteur peut fuir rapidement dans la sous-phase.

Ces études utilisant des vésicules permettent de conclure qu'il est possible d'obtenir des transferts d'électrons entre la Chl a et des quinones incorporés dans une bicouche lipidique. Aussi, il est possible de moduler l'efficacité de ces transferts à l'aide de charges de surface.

1.2.3. Méthode des films noirs, BLM

La méthode consiste à appliquer, à l'aide d'un pinceau, dans un trou percé

dans une paroi de téflon séparant deux compartiments aqueux, une solution organique contenant les lipides et pigments que l'on veut étudier. Il y a alors réorganisation des molécules, au niveau de l'orifice percé, en structure bimoléculaire. Cet arrangement est tel qu'il en résulte alors une maximisation des interactions hydrophobes entre les chaînes aliphatiques et des interactions hydrophyles entre les têtes polaires et l'eau. Lorsque l'on observe ce phénomène à l'aide d'une lumière blanche placée à angle, le film passe par toutes les couleurs de l'arc-en-ciel puis devient totalement noir. Ceci est dû aux patrons d'interférence optique causés par l'épaisseur du film. Ces films noirs portent le nom de "**Black Lipid Membranes**" ou BLM (Ti Tien, (1982)). Lors de la formation de ce film, les pigments, les lipides et/ou les protéines se répartissent et s'orientent au hasard, ce qui conduit à leur répartition symétrique de part et d'autre de la bicouche. Il n'existe donc aucun contrôle possible quant à la répartition des différents constituants lors de la formation du film. Ce fait est important et il constituera le principal facteur en défaveur de ce système modèle, comme nous le verrons plus loin.

Dans le cadre de notre travail, les résultats les plus importants sont ceux obtenus par le groupe de H. Ti Tien. En 1982, Wang et coll., ont démontré que lorsque l'on applique un champ électrique externe à une BLM contenant une porphyrine-quinone, i.e. une porphyrine liée d'une façon covalente à une quinone, et que l'accepteur, dans la phase aqueuse, se situe du côté positif du champ, les photocourants produits sont supérieurs à ceux obtenus dans la situation de champ inverse.

Puis, Lopez et Ti Tien, (1984) ont démontré, en utilisant des centres réactionnels, que la réaction de séparation de charges conduit à la génération d'une différence de potentiel au travers de la membrane du thylakoïde. Aussi, leurs expériences les ont conduits à supposer que les centres réactionnels sont des

complexes protéiques trans-membranaires, ce qui est en complet accord avec Deisenhofer et coll. (1985a, 1985b) et Michel et coll. (1986). De plus, tous les effets photoélectriques observés requièrent l'addition de transporteurs en solution aqueuse pour éliminer les produits oxydés et réduits, et empêcher les recombinaisons de charges; ce qui souligne le problème de symétrie des BLM.

D'autres études ont aussi démontré que des extraits chloroplastiques incorporés dans des BLM ont donné les meilleurs résultats lorsqu'on les compare avec des porphyrines: ce qui indique l'importance de plusieurs autres facteurs dans l'appareil photosynthétique (comme la structure tridimensionnelle des complexes chlorophylle-protéine et les transporteurs d'électrons secondaires) (Kutnik et Ti Tien (1983)).

1.2.4. Comparaisons, avantages, inconvénients

Il est évident que chacune des techniques mentionnées comporte des avantages et des inconvénients qui la rendent unique. Revoyons donc chacune d'elles en détail. Dans le cas des films Langmuir-Blodgett, les expérimentateurs disposent d'un avantage indéniable, le positionnement d'électrodes de surface, directement sur le film à étudier. Les phénomènes électriques qui se produisent au niveau du film sont aisément identifiables et quantifiables. Toutefois, cet arrangement ne correspond pas du tout à ce que l'on peut retrouver *in vivo*. En effet, il se produit un réarrangement important des molécules lorsque nous effectuons des dépôts mono- et multimoléculaires et que nous déposons les électrodes (Fringeli et Günthard, (1981)). Ces auteurs ont démontré, par microscopie électronique, que les différentes couches se réorganisent spontanément en ultrastructures possédant la forme d'îlots plats, irréguliers et d'épaisseur variable. Certains phénomènes de recristallisation sont aussi visibles dans

les cas de phospholipides purs. Tout ceci amène à douter de la vision que la plupart des gens se font des films Langmuir-Blodgett, selon laquelle les molécules sont bien alignées les unes par rapport aux autres en couches uniformes et bien empilées les unes sur les autres.

En ce qui concerne les études portant sur les vésicules, la méthode se rapproche un peu plus des systèmes naturels. Les composants sont organisés en bicouche. L'organisation structurale possède deux compartiments aqueux auxquels on a accès, mais seulement lors de la formation de la vésicule. Il est possible d'obtenir une asymétrie de composition dans les sous-phases. Toutefois, il est impossible de contrôler la répartition des lipides dans la bicouche. De plus, la grande courbure devient un facteur considérable de ségrégation dont il est difficile de quantifier l'effet (Ford et Tollin, (1982), Murphy, (1982), Gounaris et coll., (1983)). Un autre inconvénient majeur est qu'il faut absolument incorporer un couple redox de part et d'autre de la bicouche pour éviter le phénomène de recombinaison des charges.

Avec les BLM, la méthode de reconstitution se rapproche encore plus des systèmes naturels en ce sens que les bicouches sont maintenant planes. En effet, il n'existe plus de ségrégation moléculaire due à la courbure de la membrane. De plus, comme le démontre la figure 3, le thylakoïde présente une surface majoritairement plane, et donc les BLM nous permettront de mieux mimer le comportement des différents constituants. Les deux sous-phases sont accessibles permettant ainsi de contrôler l'asymétrie électrolytique de ces compartiments aqueux. Toutefois, comme dans le cas des vésicules, aucun contrôle sur la symétrie d'incorporation des constituants dans la bicouche n'est possible. En fait, cette dernière est de composition symétrique, car il ne peut en être autrement. De plus, il existe une importante région de transition sur le pourtour de la bicouche, le torus, dont nous

ne connaissons que très peu de chose. Il est possible, voire certain, que la présence de cette zone de transition influence énormément les propriétés électriques de la bicouche. Ainsi, il est probable qu'un produit particulier que nous voulons étudier puisse se retrouver, non pas dans la bicouche, mais bien dans le torus, ce qui conséquemment pourrait fausser l'interprétation des résultats.

Comme nous pouvons le voir, ces techniques nous ont apporté des renseignements importants sur les transferts d'électrons dans les milieux organisés. La présence de charges de surface, ou d'un champ électrique externe, influence grandement les réactions de séparation de charges. Toutefois, toutes demandent l'utilisation de transporteurs externes (électrodes, couples redox) pour pouvoir fonctionner adéquatement. Quoi qu'il en soit, le problème majeur de ces techniques consiste dans le manque total de contrôle que nous avons sur l'asymétrie de distribution des constituants.

Pour citer Fang et Tollin (1983): "Il est par conséquent très apparent que l'électrostatique nous donne un puissant outil nous permettant d'affecter les phénomènes de transfert d'électron qui prennent lieu dans des vésicules lipidiques contenant de la chlorophylle. Ainsi, en manipulant les charges de surface, de même que la charge électrique nette sur l'accepteur réduit, il devrait être possible de contrôler la séparation et la recombinaison de la paire radicalaire de telle façon à augmenter le potentiel utilitaire de ces systèmes pour la conversion photochimique de l'énergie solaire. Il est probablement significatif, dans ce contexte, que les membranes des thylakoïdes contiennent une petite proportion ($\approx 8\%$) d'un sulfolipide négativement chargé."

Il semble donc établi qu'il faille porter une attention particulière au problème d'asymétrie membranaire.

1.2.5. L'asymétrie membranaire

Il est maintenant reconnu que l'asymétrie membranaire, de même que l'hétérogénéité de la membrane, jouent toutes deux un rôle important dans le fonctionnement des systèmes naturels en général (Op den Kamp, (1979), Op den Kamp, (1981), Miljanich et coll., (1981)), et dans le cas du processus photosynthétique en particulier (Radunz, (1980), Gounaris et coll., (1983), Murphy et Woodrow, (1983)). Cette asymétrie, lipidique et protéique, n'est pas seulement trans-membranaire, mais aussi latérale. En effet, nous retrouvons plus de Photosystèmes II (P680) dans les régions planes des thylakoïdes que dans les régions courbes situées aux extrémités. A l'inverse, nous rencontrons plus de galactolipides et de Photosystèmes I (P700) dans les régions courbes que dans les régions planes. Il existe aussi une asymétrie de charges à la surface des thylakoïdes. En fait, la face interne possède une densité de charges de surface de $-3,4 \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$ alors que celle de la face externe est de $-2,1 \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Duniec et Thorne, (1980), Thorne et Duniec, (1983)). Les deux faces portent une charge négative mais la face interne, celle qui se situe du côté du donneur d'électron, est la plus négative des deux. Il devient donc intéressant de pouvoir bénéficier d'un outil nous permettant de contrôler l'asymétrie d'incorporation des constituants membranaires, i.e. d'incorporer asymétriquement le donneur et l'accepteur d'électron dans une bicouche lipidique dont nous contrôlerons aussi l'asymétrie des charges de surface. Ainsi, nous serons en mesure de mieux mimer les membranes biologiques naturelles.

1.2.6. Nouvelle approche: méthode de Müller-Montal

Montal et Müller ont rapporté la formation de bicouches lipidiques asymé-

triques en 1972. Leur façon de procéder est basée sur une méthodologie décrite par Takagi et coll. (1965). La bicouche lipidique est préparée au travers d'une ouverture (250 μm de diamètre) percée dans un film de téflon séparant deux solutions aqueuses. Les lipides sont étalés à l'interface air-eau de chaque côté du trou, puis le film de téflon est descendu sous l'eau entre les deux sous-phases. Montal a modifié la méthode originale de Takagi en suggérant d'élever alternativement les niveaux d'eau. De toute manière, dans les deux cas, les lipides s'organisent au niveau du trou en bicouche lipidique. Une vision schématique de la méthode est présentée à la figure 4 et décrite ci-après.

Tout d'abord, les lipides sont étalés à la surface de chacun des bains (fig. 4.a.[1]). Puis, on élève avec précaution le niveau d'eau d'un côté du trou pour l'amener au-dessus de celui-ci (fig. 4.a.[2]). Ensuite, le niveau d'eau du second côté est élevé pour que les deux films entrent en contact (fig. 4.b.[3]). On élève, toujours avec précaution, le niveau du second côté et ainsi, une bicouche lipidique est formée (fig. 4.b.[4]).

Peu d'expériences portant sur les transferts d'excitation ont été effectuées en utilisant cette méthode. Elle soulève certains problèmes de conception théorique tels: i) la présence obligatoire d'un torus, toutefois considérablement moins volumineux que dans le cas des BLM; ii) la thermodynamique des systèmes qui n'est pas favorable (γ interfaciaux entre les lipides, l'air et l'eau et donc angles de contact entre les lipides et le film de téflon, balance des forces hydrophobes et hydrophiles, lipides chargés provoquant des champs électriques, etc); iii) des problèmes de reproductibilité qui nous obligent à travailler sur des ensembles statistiques pour obtenir des résultats probants (White et coll. (1976), White, (1986)).

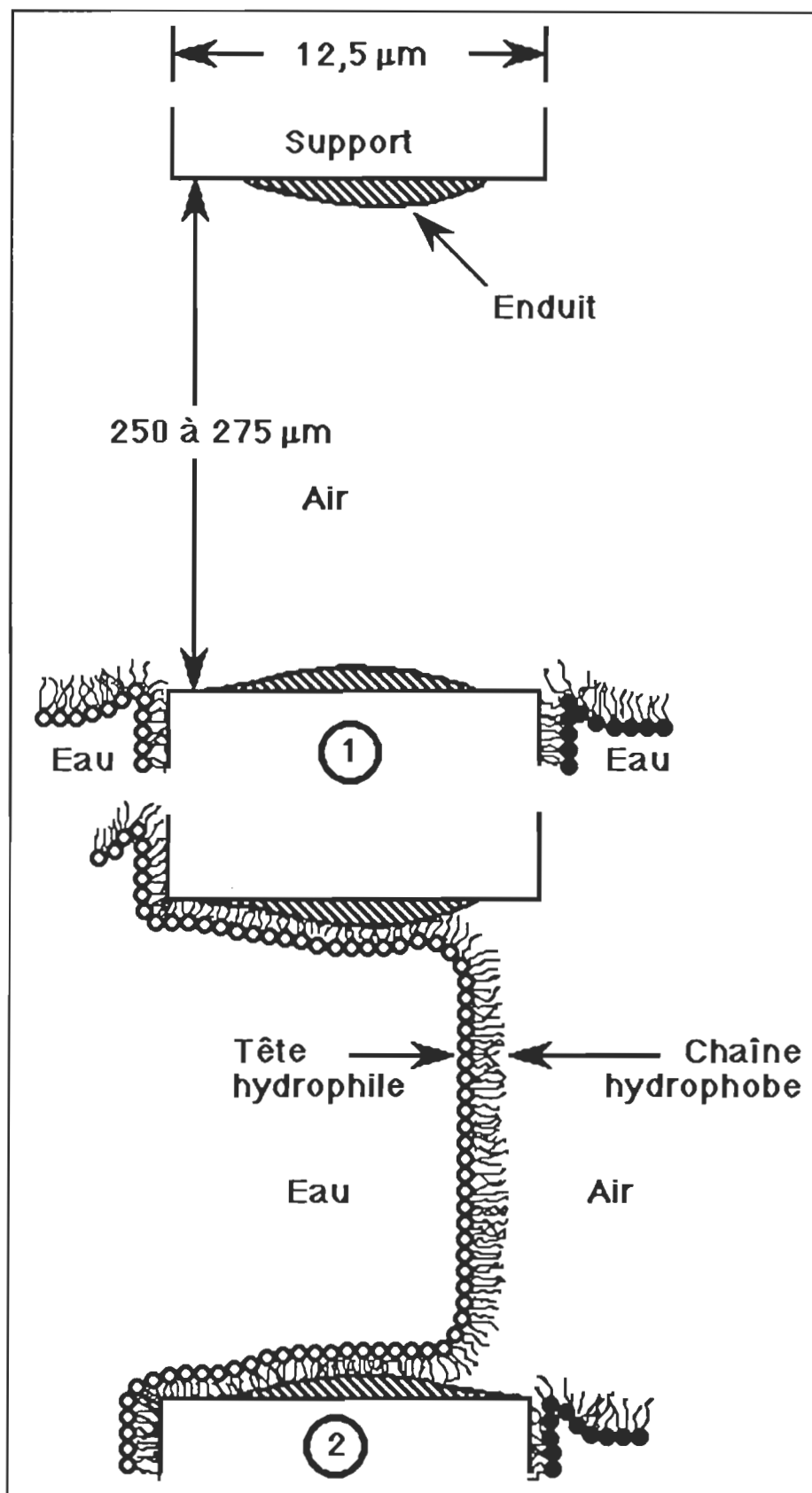


Figure 4.a. Diagramme de formation d'une bicouche

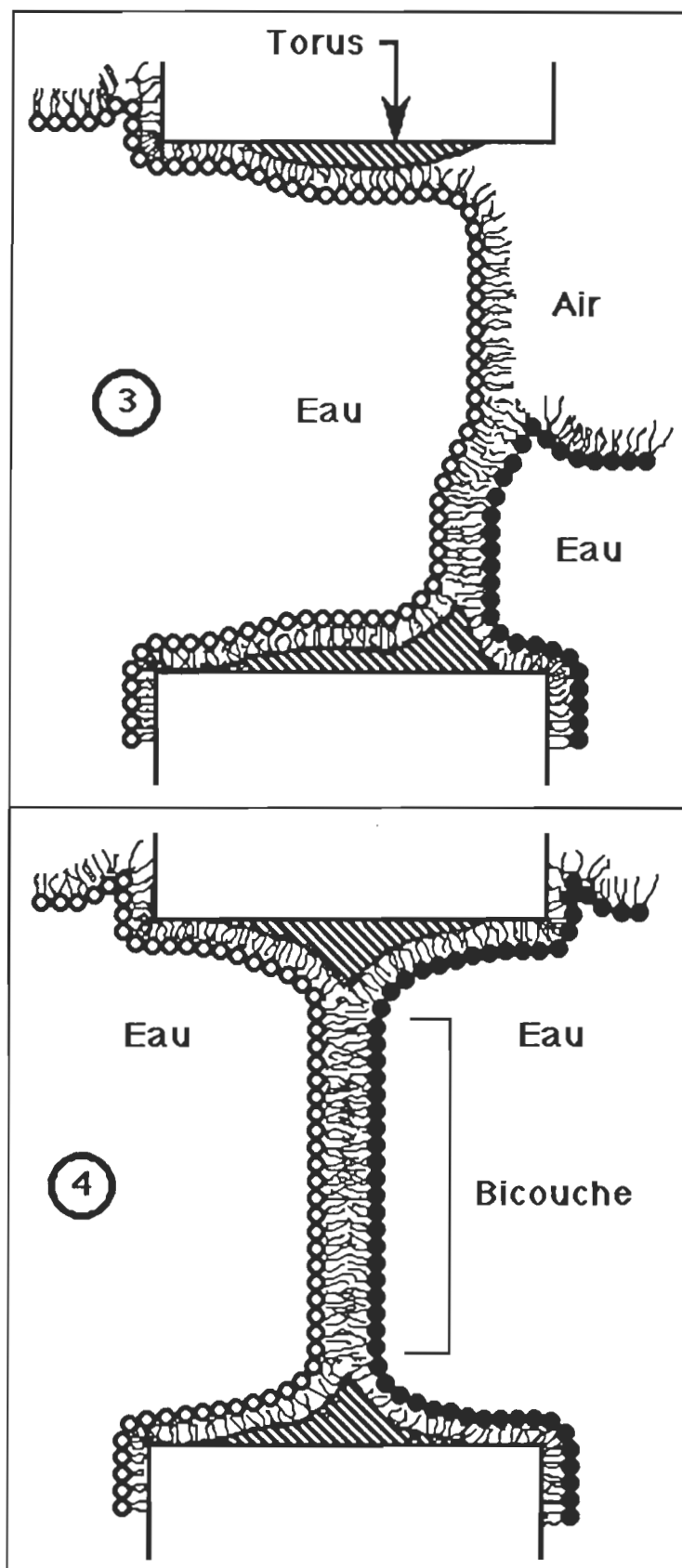


Figure 4.b. Diagramme de formation d'une bicouche

A ce propos, une citation de White (1986) illustre bien ceci: "Les bicouches planes peuvent se révéler incroyablement frustrantes. Tous ceux qui, parmi nous, ont eu à travailler avec elles ont été, à un moment ou à un autre, réduits à des actes de colère, irrationnels certes mais ô combien satisfaisants! Nombre de frustrations originent habituellement du fait que nous tentons - inconscients que nous sommes - de faire des choses thermodynamiquement invraisemblables".

Toutefois, certains résultats encourageants ont été obtenus sur des systèmes de reconstitution très complexes par l'équipe de Montal (Schönfeld et coll., (1979)). Ces auteurs ont réussi à incorporer des centres réactionnels provenant d'un mutant de *Rhodopseudomonas sphæroïdes* dans des bicouches en utilisant la technique de Müller-Montal. L'incorporation asymétrique de centres réactionnels a pu être accomplie et des mesures de transferts d'électrons entre donneurs et accepteurs secondaires introduits dans les sous-phases furent réalisées. Il a été ainsi démontré directement que la transduction de l'énergie lumineuse est rendue possible grâce à l'établissement d'un courant électrique transmembranaire, ceci apportant la preuve de la faisabilité de la méthode de reconstitution membranaire.

Cette technique présente l'indéniable avantage de permettre la reconstitution de bicouches planaires dont la composition, de part et d'autre, est asymétrique. Cette asymétrie est très stable dans le temps comme l'ont démontré Hall et Latorre (1976) et Hall (1981). Leurs expériences, effectuées sur des bicouches asymétriques composées de phosphatidyléthanolamine et de phosphatidylsérine, indiquent que le passage d'un lipide d'un côté à l'autre de la bicouche, ou flip-flop, est très lent et inférieur à une molécule sur quarante-cinq ($1/45$) durant 10 heures.

Cette technique possède toutefois deux difficultés notables. Comme le

souligne White (1986), on doit utiliser un enduit de gelée de pétrole ou d'huile de silicone pour "conditionner" le pourtour du trou sinon il est impossible de former une bicouche. En effet, il est impossible, théoriquement et pratiquement, de réaliser la formation d'une bicouche sur un support de téflon propre et totalement inerte. L'enduit a pour fonction de rendre le téflon oléophile, si bien qu'une zone de transition non-polaire entre la bicouche et le film de téflon est créée lorsque la bicouche est complétée. La présence de cette zone de transition est essentielle (White et coll., (1976)). Le second problème réside dans le fait que l'on ne contrôle pas parfaitement les propriétés de surface du film que l'on dépose. En effet, les lipides sont déposés sur une toute petite surface et en quantité relativement importante. Il peut en résulter un amoncellement de plusieurs couches lipidiques et/ou une ségrégation latérale des composants du film. Lorsque l'on travaille seulement avec un lipide, le problème de ségrégation latérale ne se pose pas et l'amoncellement de multi-couches n'occasionne aucun tracass. Toutefois, lorsqu'il faut inclure des pigments ou des protéines, ce problème de ségrégation peut se trouver accentué. De fait, la microcomposition exacte du film qui se situe près de l'orifice percé dans le film de téflon, et qui déterminera la quantité exacte de produits qui sera effectivement incorporée dans la bicouche, demeure inconnue. Ainsi, il faudra tenir compte que, d'une expérience à l'autre, ces différences de microcomposition apporteront des différences dans le comportement des bicouches (tant électrique qu'optique). Ces différences pouvant être relativement importantes, il conviendra alors d'effectuer un grand nombre de mesures pour en tirer un résultat statistique probant. Ce problème mérite d'être gardé en mémoire pour l'interprétation des résultats, en particulier si des systèmes complexes constitués de plusieurs composants sont utilisés pour la reconstitution membranaire.

Section 1.3. But du travail et moyens utilisés

Le but du travail est de tenter de comprendre quelle sera l'influence de certains facteurs sur l'efficacité de transfert d'électrons dans un milieu organisé: la bicouche lipidique. Nous utiliserons un système modèle, notre propre version de la technique de Montal, et nous étudierons les réactions de transferts d'électrons entre la chlorophylle a, qui servira de donneur, et la plastoquinone-9, qui servira d'accepteur.

Les facteurs auxquels nous nous attarderons seront: la charge de surface, l'influence de contre-ions dans la sous-phase et l'asymétrie d'incorporation. Des mesures électriques de conductance et de résistance membranaire seront effectuées, concurremment à des mesures de fluorescence, fluorescence qui proviendra de la chlorophylle a. L'analyse de ces résultats nous permettra donc de tirer des conclusions quant à l'influence que les facteurs précédemment mentionnés auront sur l'efficacité de transfert d'électrons. Nos études pourront aussi apporter des éléments de réponse en ce qui concerne la possibilité que l'orientation du moment dipolaire des hélices- α des protéines puisse affecter le transfert d'électrons *in vivo*.

Chapitre 2. MATERIEL ET METHODE

Le présent chapitre contient toute la documentation nécessaire sur l'expérimentation réalisée. Nous débutons par une description détaillée du montage expérimental et de ses différentes composantes, pour ensuite étudier en détail le bain de reconstitution membranaire proprement dit, de même que l'appareillage optique, informatique et électronique utilisé. Les différents produits chimiques employés lors des expériences de reconstitution membranaire seront aussi décrits.

Section 2.1. Montage expérimental

Nous débuterons par une vue d'ensemble de l'appareillage utilisé. Une représentation schématique est présentée à la figure 5. On peut y voir qu'il existe quatre sous-sections importantes. Ces sous-sections seront traitées indépendamment ci-après et sont: le bain de reconstitution membranaire (fig. 5.A-G), l'appareillage d'excitation optique (fig. 5.H-I), l'appareillage de détection optique et de traitement des données (fig. 5.J-R) et celui de prise de mesures électriques (fig. 5.AA-EE). [Note: dans tout le reste du texte les renvois aux figures suivront ce genre de nomenclature, exemple: fig. 5.E veut dire un renvoi à l'élément E que l'on retrouve à la figure 5.].

2.1.1. Bain de reconstitution membranaire

Le bain de reconstitution membranaire, constituant le cœur du montage, est représenté sur la figure 5 par la lettre A. Une vue détaillée en perspective est présentée à la figure 6.A. Ce bain est construit de téflon noir, i.e. un téflon dans lequel du noir de charbon fut introduit lors de la synthèse (Miller Plastics, Dorval, Québec).

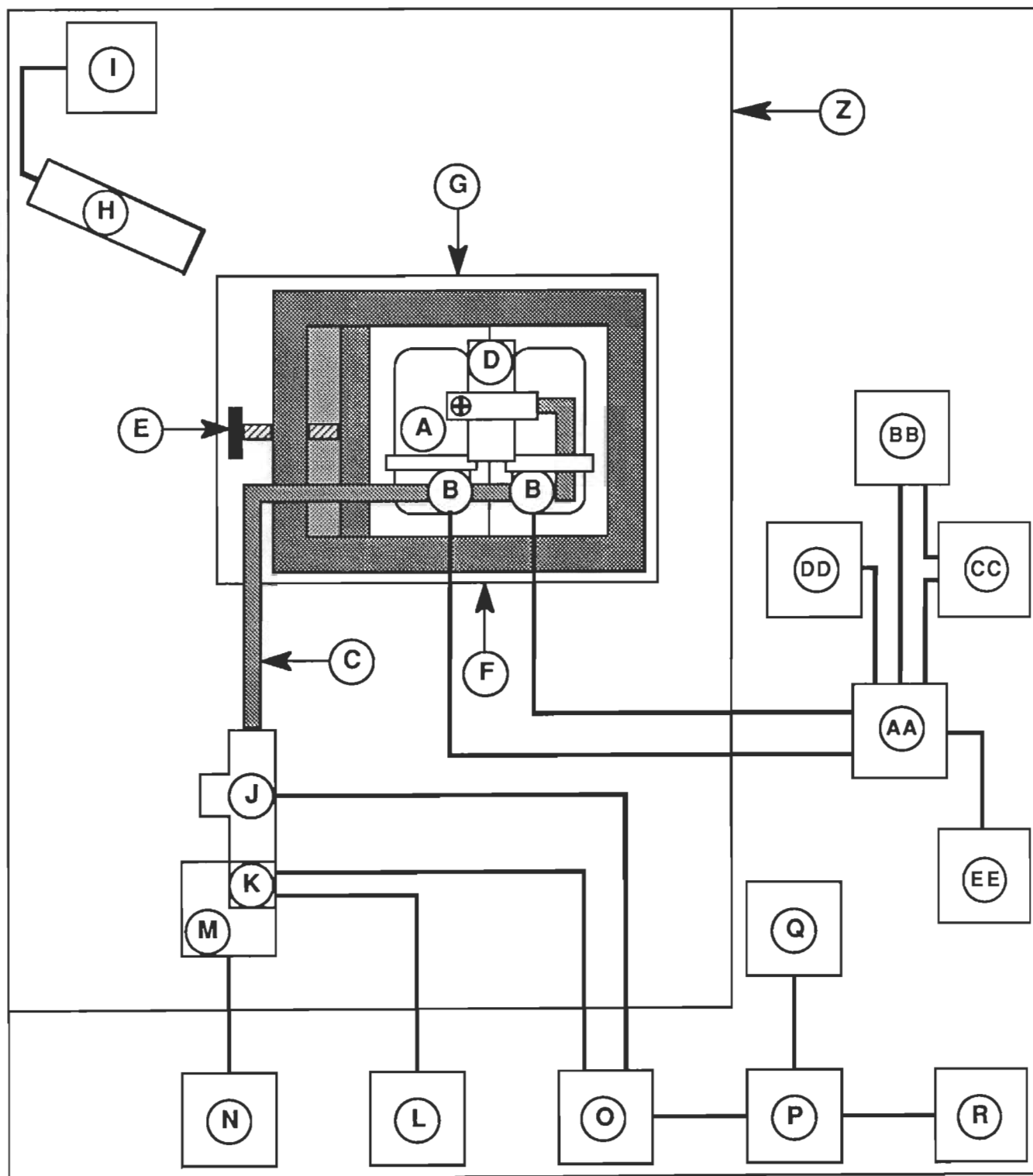


Figure 5. Schéma du montage expérimental

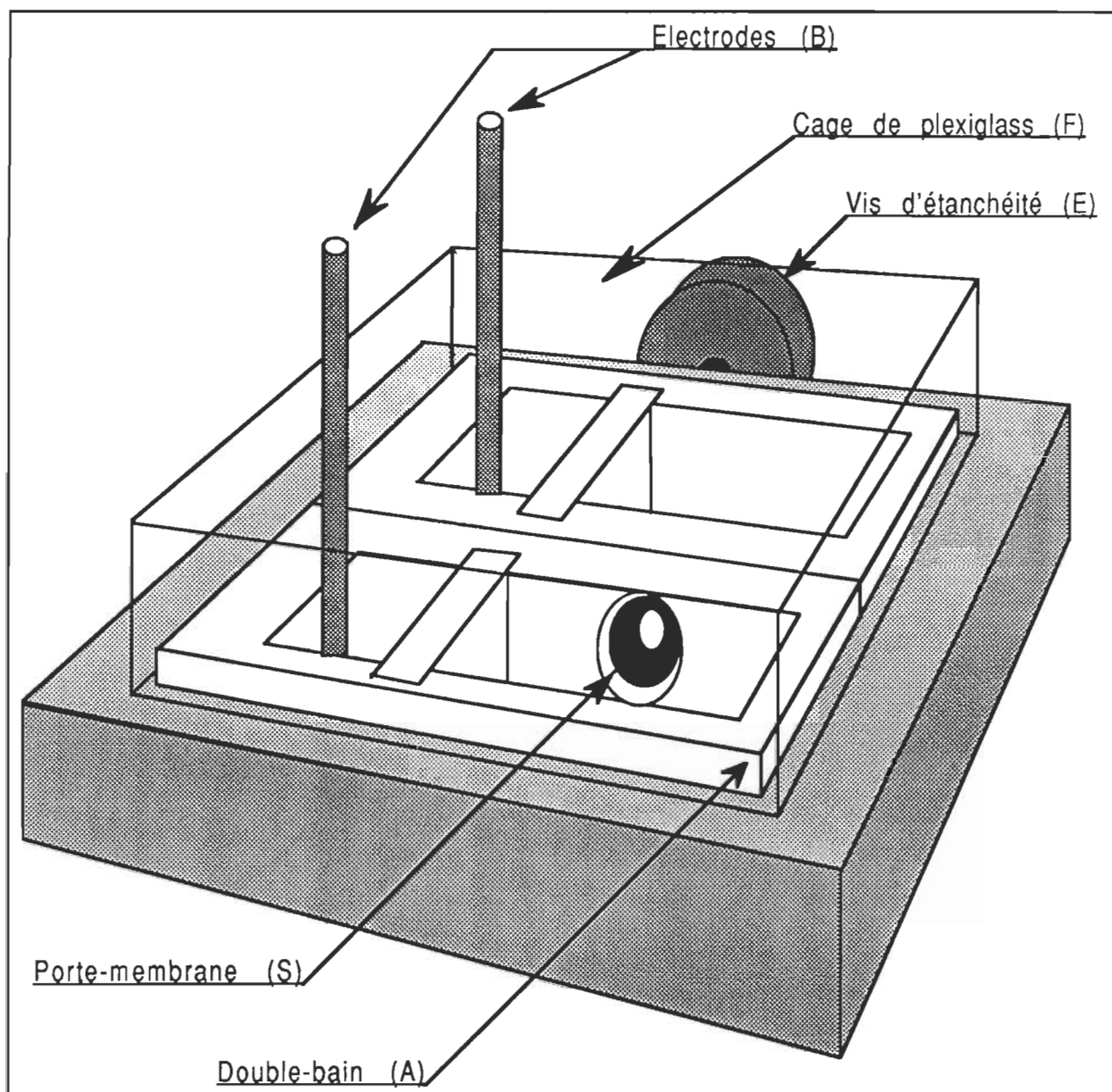


Figure 6. Vue en perspective du double-bain

Ce matériau allie les excellentes propriétés électriques isolantes du téflon conventionnel à une réflexion minimale de la lumière, ce qui, dans notre cas, s'avère un avantage considérable pour éliminer la lumière parasite. Les dimensions externes du bain sont de 14x16x5 cm. Le bain de reconstitution est composé en fait de deux bains accolés l'un à l'autre et séparant deux phases aqueuses (c'est pourquoi il sera librement fait allusion au bain, ou au double-bain). Les deux bains sont indépendamment accessibles et nous pouvons contrôler les paramètres voulus (e.g. pH, composition des sous-phases) dans chacun d'eux.

Les deux parties du double-bain sont insérées dans une enceinte de plexiglass (fig. 5.F, Johnston Industrial Plastics, Ville La Salle, Québec). L'étanchéité est rendue possible grâce à une vis (fig. 5.E, 6.E) qui maintient les deux parties ensemble, accolées l'une à l'autre. Ce système nous permet aussi de travailler plus efficacement lors du changement de film de téflon. Le double-bain contient aussi deux électrodes (fig. 5.B, 6.B) qui serviront aux mesures électriques, comme nous le verrons plus en détail à la section 2.1.4. Comme nous pouvons aussi le voir à la figure 6, à la jonction des deux bassins se trouve ce que nous appellerons le porte-membrane (fig. 6.S).

La figure 7 présente une vue explosée de cette partie essentielle du montage qu'est le porte-membrane. Ce porte-membrane (fig. 6.S, 7.S) est composé de deux disques fabriqués de téflon noir. Nous pouvons y voir clairement de quelle façon le film de téflon (fig. 7.T) est inséré entre les deux parties du porte-membrane. Le film de téflon est d'une épaisseur de 12,5 μm (Fluorocarbon, Dilectrix Division, Lockport, New York). C'est au travers de ce film que sera percé l'orifice au travers duquel aura lieu la reconstitution membranaire. Cette pièce est insérée entre les deux bains et la vis de serrage (fig. 6.E) permet d'assurer l'étanchéité parfaite entre les deux bains.

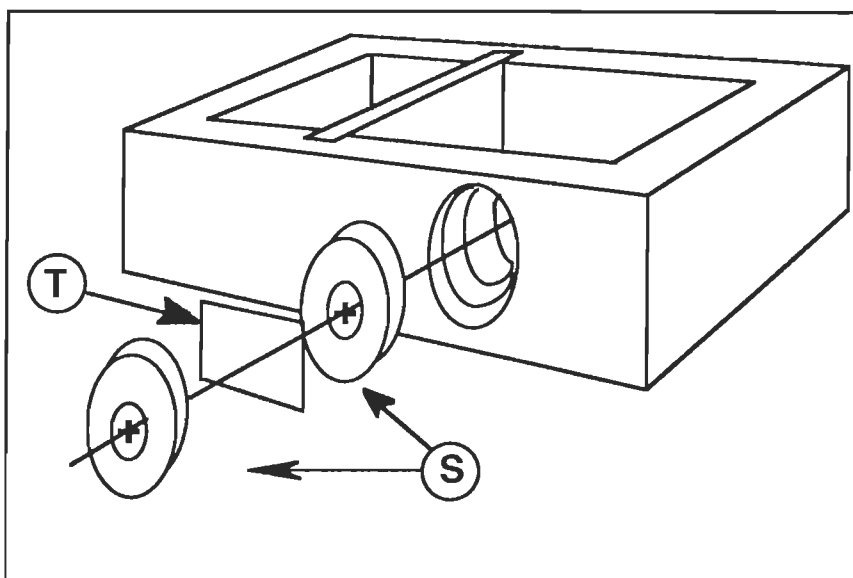


Figure 7. Détail du double-bain.

L'ouverture est créée dans le film en utilisant le poinçon à matrice présenté à la figure 8 (Y). Un trou du diamètre désiré (250 à 275 μm) est percé dans le manchon (fig. 8.X). La mèche de perceuse (fig. 8.W) utilisée pour fabriquer le trou est équerrie pour en faire un poinçon et sert à percer le trou au travers du film (fig. 8.T). Avant d'être percé, le film de téflon est maintenu en serre dans un porte-membrane (fig. 6.S, 7.S et 8.S). Cette pièce est insérée directement entre les deux bassins. Ainsi, l'ouverture est précisément percée et positionnée dans le double-bain exactement à la même position. En agissant ainsi, l'alignement optique optimal est conservé à toutes les fois qu'un nouveau film est inséré.

Il importe de spécifier ici que tout le système mécanique du double-bain, que nous venons de décrire, ainsi que le système optique d'excitation et de détection, que nous verrons, sont installés sur une table anti-vibration à air comprimé (fig. 5.Z, Technical Manufacturing Corporation, modèle Micro-g, Woburn, Massachu-

setts) et ce pour éviter toute perturbation mécanique extérieure, les membranes Müeller-Montal en cours de formation étant extrêmement fragiles.

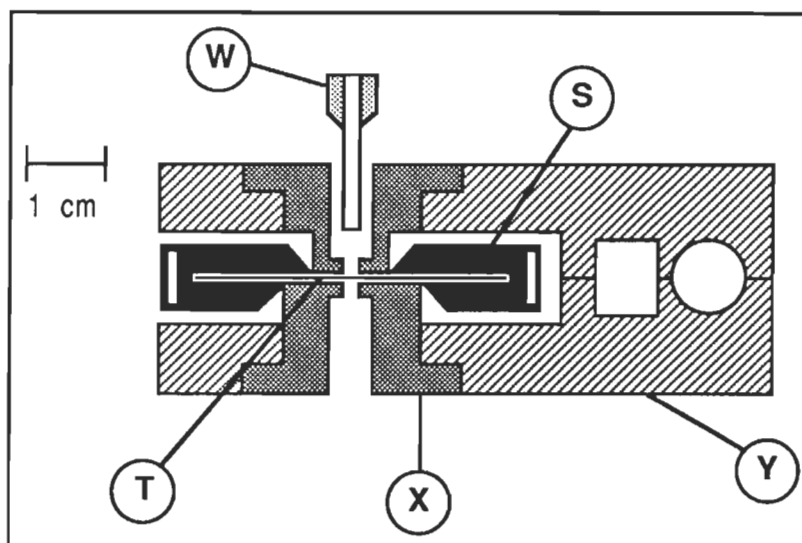


Figure 8. Poinçon à matrice.

2.1.2. Appareillage optique

2.1.2.1. Excitation

Tout au long de cette étude sur les transferts d'excitation, un laser a été utilisé pour exciter le chromophore employé dans les expériences de reconstitution membranaire. Le laser utilisé est du type hélium-néon et émet à 632,8 nm (fig. 5.H, Spectra Physics, modèle 120, San Jose, Californie) à une puissance d'environ 4 mW. Ce laser est alimenté par une source spéciale (fig. 5.I, Spectra Physics, modèle 256). Le faisceau possède un diamètre de 1 mm, lequel peut être aisément aligné sur le trou percé au travers du film de téflon.

2.1.2.2. Détection

Le signal de fluorescence émis par le chromophore est capté par une fibre optique en quartz (fig. 5.C, Oriel, Radionic Limité, modèle 77538, St-Laurent, Québec) possédant une extrémité circulaire, placée dans le bain, pour permettre de capter le plus de lumière possible, et une extrémité rectangulaire qui permet une meilleure transmission des signaux au monochromateur (fig. 5.J, Jobin-Yvon, Instrument SA, modèle H-20, Metuchen, New Jersey).

Le monochromateur est couplé à une photocathode (fig. 5.K, Hamamatsu, Pacific Precision Instruments, modèle R928, Concord, Californie) qui est mise sous tension par la source de puissance d'un photomètre (fig. 5.L, Pacific Precision Instruments, modèle 110). Cette photocathode se trouve dans une enceinte refroidie par effet Peltier (fig. 5.M, Pacific Precision Instruments, modèle 3461) jusqu'à -20°C , dans le but d'en augmenter la sensibilité de même que le rapport signal/bruit. L'alimentation en courant est assurée par une source indépendante (fig. 5.N, Pacific Precision Instruments, modèle 33).

Le signal électrique émis par la photocathode est capté par un système de comptage de photons (fig. 5.O, Instrument SA, modèle S.730.00.000, Spectra Link). Cet appareil s'occupe de l'avance et du recul du monochromateur, de l'amplification du signal et du comptage du nombre de photons. Pour effectuer cette dernière opération, le signal amplifié est comparé à une référence. Si le signal est supérieur en intensité à cette référence (que l'on peut ajuster), alors le compteur compte une unité. Ce comptage s'effectue durant une certaine période de temps pouvant aller de 0,001 à 65 secondes. Les résultats sont emmagasinés dans la mémoire centrale du Spectra Link. Nous avons calibré la réponse de notre

système de détection optique à l'aide d'un standard d'émission (Optronic Laboratories Inc, modèle 220M, numéro M-320, Orlando, Floride) dans la gamme de longueur d'onde qui nous intéresse, c'est-à-dire de 650 à 800 nm. Cet étalonnage, présenté à la figure 9, nous permettra d'effectuer des mesures absolues d'émission de fluorescence.

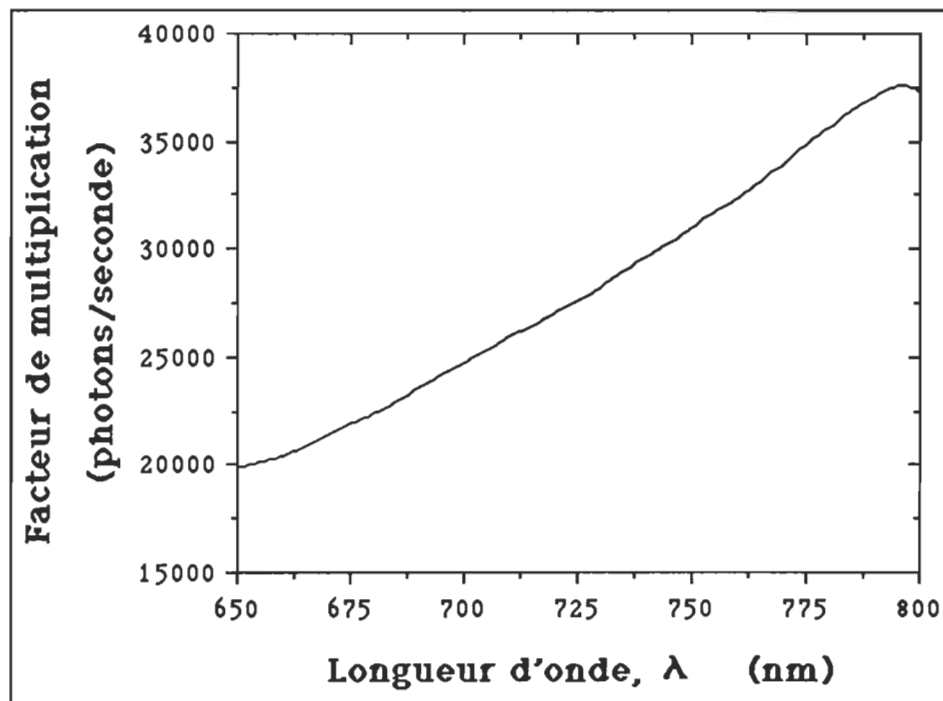


Figure 9. Calibration du système de détection optique.

Le positionnement de la fibre optique (fig. 5.C) près de la membrane est rendu possible par la pièce montrée à la figure 10 (aussi fig. 5.D). Cette pièce permet à la fibre optique de se mouvoir selon les trois axes de l'espace, et a été construite ainsi pour permettre de maximiser la prise du signal de fluorescence émis par la bicouche. Lorsque le signal est maximisé, la fibre optique peut être repositionnée exactement à la même place.

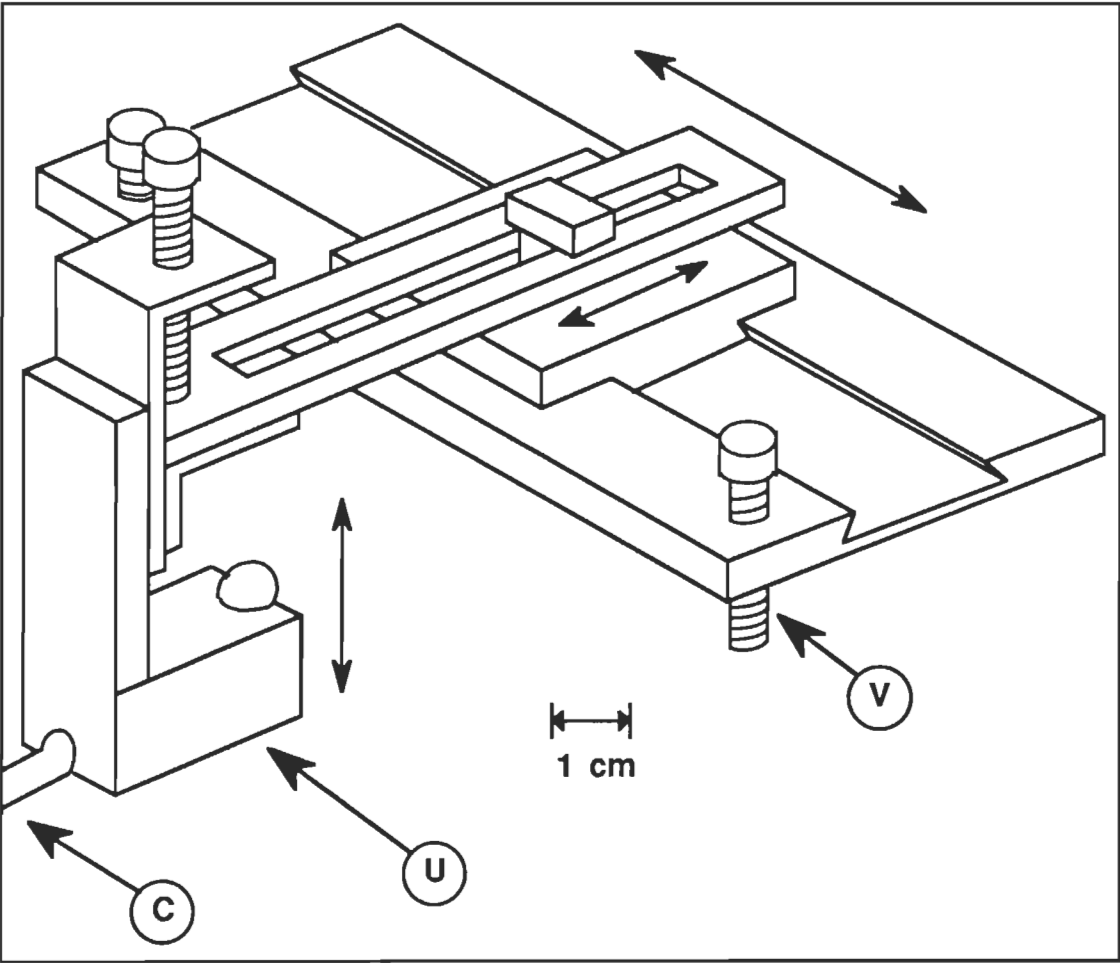


Figure 10.Support de fibre optique

Ainsi, il est possible de comparer les différents résultats obtenus lors d'expériences différentes tout en étant certain de l'exactitude de ces mêmes valeurs. Cette pièce est entièrement fabriquée en téflon (Johnston Industrial Plastics). Toutefois, de façon à minimiser les réflexions optiques parasites qui originent du téflon blanc ordinaire, la section qui retient la fibre optique a été fabriquée à l'aide d'un téflon noir (fig. 10.U, Miller Plastics, Dorval, Québec). Cette pièce est fixée au double-bain par deux vis (fig. 10.V).

2.1.3. Interface informatique

2.1.3.1. Appareillage

Les données de fluorescence entreposées dans la mémoire interne du Spectra Link sont extraites et traitées, le compteur à photons étant relié à un micro-ordinateur (fig. 5.P, Apple, Micro-Contact, modèle Ile, Lévis, Québec) à l'aide d'une carte série RS-232 (Apple, Micro-Contact, Super Serial Card). Ce micro-ordinateur est lui-même relié à une unité de stockage sur disque (fig. 5.Q, Apple, Micro-Contact, Duo-Disk Drive) et à une imprimante (fig. 5.R, Epson, Micro-Contact, modèle FX-80) par une carte d'interface parallèle PKASO (Micro-Contact).

2.1.3.2. Programmation

Les différents programmes de traitement de données utilisés ont été écrits en Applesoft™ Basic. Quelques-uns de ces programmes sont du domaine public et ont été achetés. Toutefois, nous avons dû rédiger la majeure partie des logiciels, lesquels sont présentés à l'annexe I. Les trois programmes sont: [1] INPUT.DATA, qui permet de faire communiquer entre eux l'ordinateur et le compteur de photons. Ainsi, les spectres de fluorescence pourront être enre-

gistrés, corrigés et emmagasinés sur disque. [2] ASOFT8BIT permet d'assurer une communication à 8 bits. En effet, le problème majeur des Apple IIe est qu'ils communiquent toujours à 7 bits. Il aura fallu contourner ce problème, ce que permet ASOFT8BIT. Enfin, [3] MEMBRANE est un logiciel permettant le calcul et la correction des mesures de capacitance membranaire, d'en effectuer un traitement statistique et d'emmagasiner les résultats sur disque.

2.1.4. Mesure des propriétés électriques

Cette section débute par une description de la bicouche lipidique du point de vue électrique. Nous verrons quel sera le circuit électrique équivalent par lequel nous pourrions simuler une bicouche. Ce circuit équivalent nous servira de base pour construire nos circuits de mesure de capacitance et de résistance. Ces circuits de mesure seront détaillés peu après.

2.1.4.1. Circuit équivalent d'une bicouche

Une bicouche lipidique peut être représentée schématiquement, du point de vue moléculaire, comme nous l'avons vu à la figure 4.b. On y observe qu'il existe une zone centrale, constituée par les chaînes aliphatiques agissant comme un isolant électrique. Cette zone isolante se comporte donc comme une résistance. De plus, comme les têtes polaires sont chargées, ou à tout le moins polarisables, la bicouche se réduit donc en définitive à un isolant séparant deux plaques conductrices, ce qui constitue un condensateur. Nous pouvons aussi apporter un raisonnement semblable en ce qui concerne le film de téflon. Le matériau constitue un excellent isolant électrique d'une grande résistance, et cette résistance induit une capacitance associée qui est elle aussi très grande. Ceci nous conduit au schéma représenté à la figure 11.

Les symboles R_m et C_m s'appliquent à la membrane, alors que R_f et C_f s'appliquent au film de téflon percé du trou au travers duquel la reconstitution membranaire s'effectue. La membrane et le film sont considérés comme deux circuits électriques en parallèle, composés chacun d'une résistance et d'un condensateur aussi en parallèle. Ces deux circuits en parallèle sont par ailleurs en série avec les électrodes (R_e), au travers desquelles les tensions sont appliquées. En ce qui concerne ces dernières, leur comportement électrique suit la loi d'Ohm et la capacitance associée à leur résistance ne possède qu'une valeur négligeable, ce qui explique l'omission, dans la figure 11, de la capacitance associée aux électrodes.

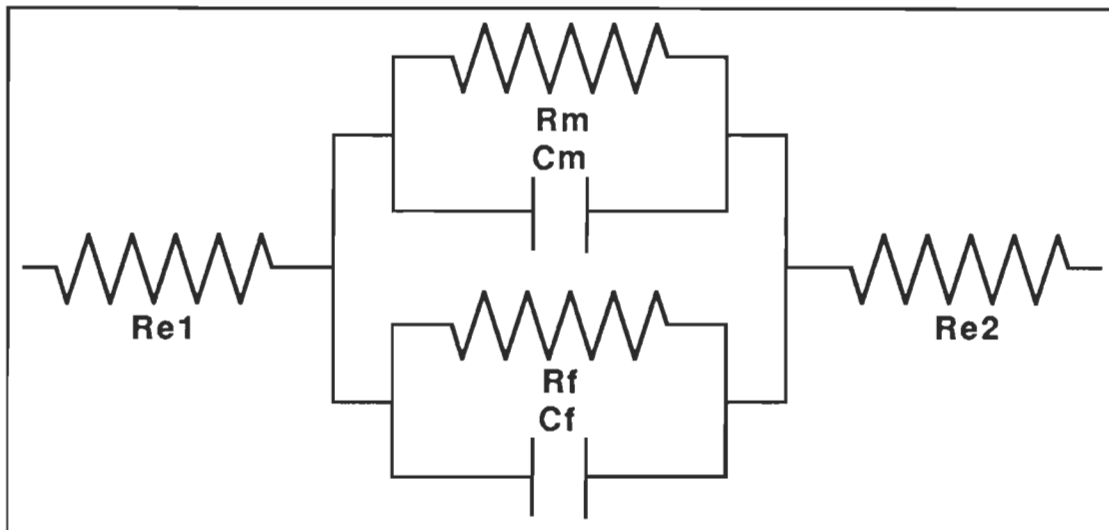


Figure 11. Circuit équivalent du système film-membrane

Lorsque nous voulons mesurer la capacitance des membranes, nous appliquons une tension alternative. Pour la membrane et pour le film, la valeur d'impédance associée au condensateur (C_m et C_f) est de beaucoup inférieure à celle de la résistance (R_m et R_f), de telle sorte que tout le courant, ou presque, "passera" dans le condensateur. Ainsi, le circuit équivalent présenté à la figure 11 peut se

réduire dans ce cas au circuit que nous présentons à la figure 12. Ce nouveau circuit, s'appliquant aux conditions prévalant pour la mesure de capacitance, comporte maintenant deux condensateurs en parallèle, reliés en série avec les deux résistances dues aux électrodes.

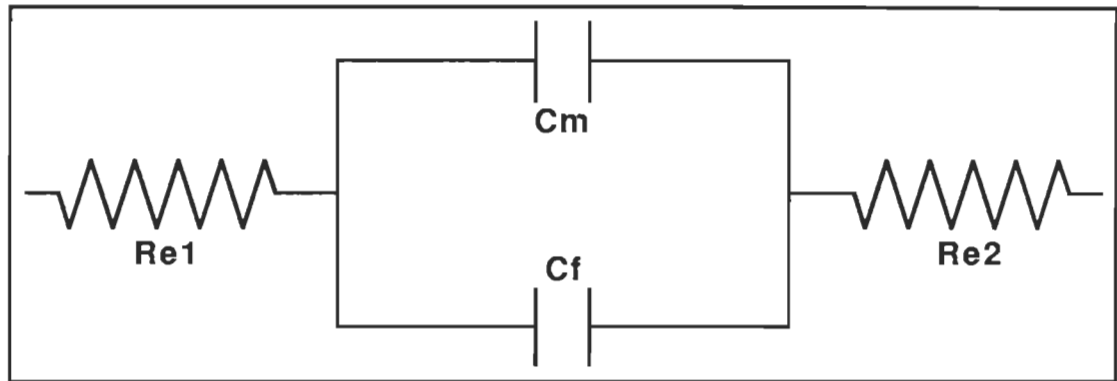


Figure 12. Circuit capacitif équivalent du système film-membrane.

Lorsque nous voulons mesurer la résistance des membranes, une tension continue est alors appliquée. Ainsi, le "condensateur associé" à la membrane, se "charge" et, si nous calculons sa résistance équivalente, on constate qu'elle devient énorme par rapport à la résistance de la membrane, R_m , et ainsi le courant passera par la résistance R_m . Le même raisonnement s'applique au film de téflon et nous pouvons alors réduire le circuit équivalent de la figure 11 à celui que nous présentons à la figure 13, qui comporte maintenant deux résistances en parallèle, R_m et R_f .

Lorsque le double-bain est bien monté, une mesure de la résistance du film de téflon indique une valeur supérieure à $500\text{ G}\Omega$. Comme les valeurs de résistance d'une bicouche varient entre 1 et $150\text{ G}\Omega$, nous pouvons maintenant considérer que le circuit équivalent se résume à une seule résistance, R_m , la résistance

de la membrane.

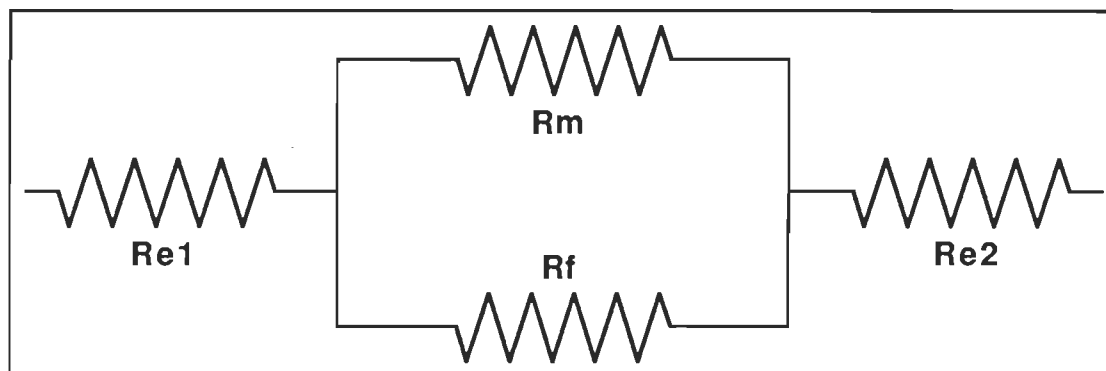


Figure 13. Circuit résistif équivalent du système film-membrane.

2.1.4.2. Capacitance

La technique utilisée pour mesurer la résistance et la capacitance spécifique membranaire est similaire en principe à celle décrite par Alvarez et Latorre (1978) et revue en détail par Robert et coll. (1985). Le diagramme du circuit de mesure de capacitance est présenté à la figure 14 et est représenté par l'indicatif 'AA' à la figure 5.

Les mesures de capacitance sont faites en comparant deux circuits RC. L'un d'eux est formé d'une résistance variable de 0-100 k Ω (R_x) et d'un condensateur de référence de 1492 pF (C_s), et est utilisé comme circuit de compensation. L'autre est formé d'une résistance variable de 0-100 k Ω (R_i) et de la membrane qui sert de condensateur (C_m). On fixe cette résistance R_i à une valeur déterminée. Cette valeur déterminera la gamme de capacitance mesurable.

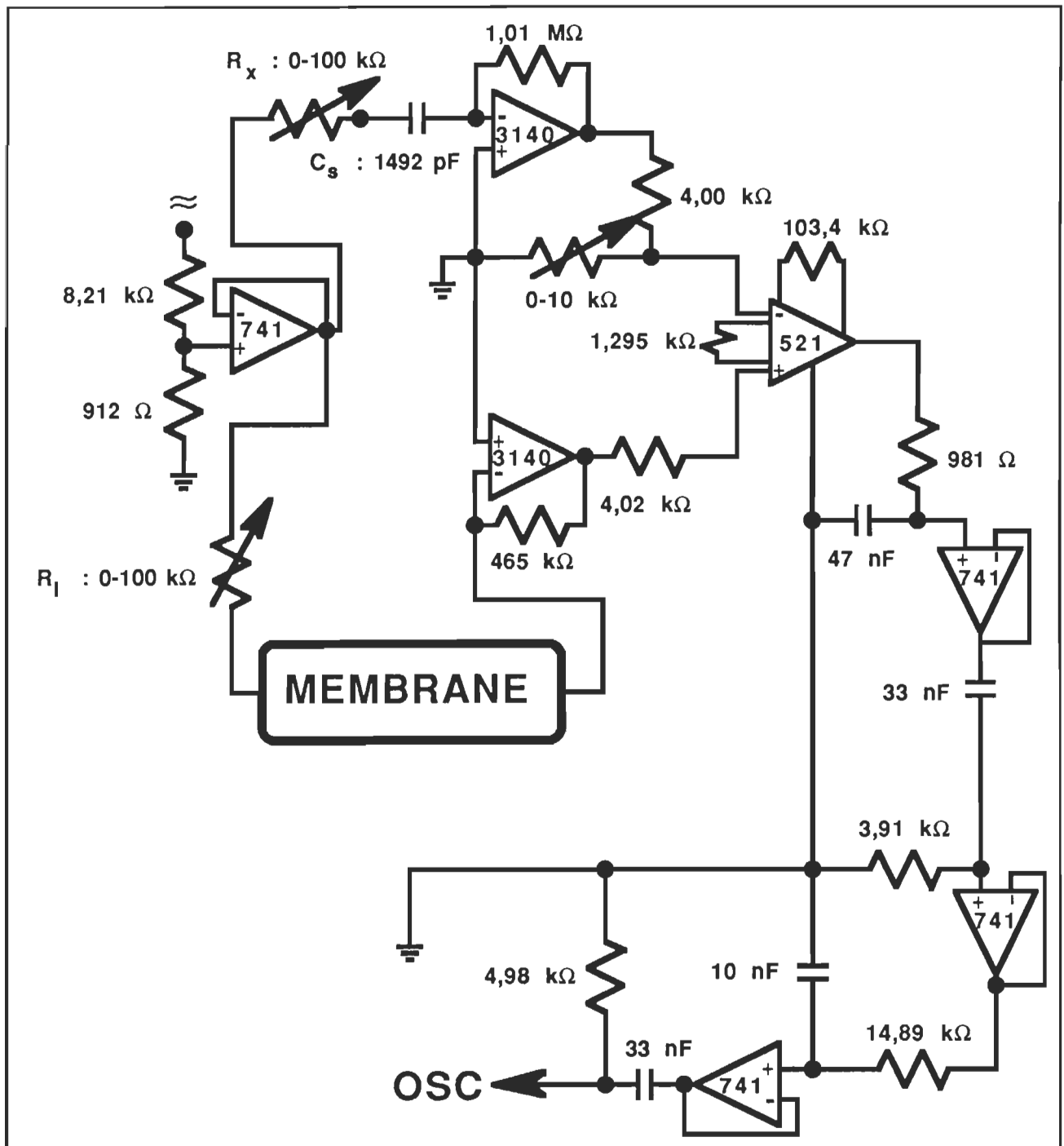


Figure 14.Circuit de mesure de capacitance

Une onde sinusoïdale de 1 kHz de fréquence et possédant une amplitude de 100 mV pic-à-pic est appliquée aux deux branches du circuit. Cette onde est transmise par des électrodes d'argent/chlorure d'argent (Ag/AgCl) (fig. 5.B) (Ingold Standard Electrodes, Spectrex, Montréal, Québec) en utilisant un générateur d'ondes (fig. 5.CC) (Hewlett-Packard, modèle 3311 A). La résistance interne des électrodes est mesurée à l'aide d'un multimètre digital (Keithley, modèle 169, Cleveland, Ohio) (fig. 5.DD). Les ondes résultantes sont comparées et soustraites par un amplificateur opérationnel (Analog Devices, modèle AD521, Norwood, Massachusetts) et le signal résultant est envoyé à un oscilloscope (fig. 5.BB) (Tektronix Canada Limited, modèle D 1011, Montréal, Québec). En faisant varier la valeur de R_x , il est possible d'équilibrer exactement les deux circuits de façon à obtenir une ligne droite sur l'oscilloscope. La capacitance de la membrane est alors calculée à partir des valeurs de R_x , R_i , R_e et de C_s selon l'équation suivante:

$$C_m = \frac{R_x \cdot C_s}{R_i + R_e}$$

En utilisant un pont de capacitance de précision (J.J.Lloyds Instruments Limited, modèle VC4, Warsash, Southampton, Angleterre) nous avons calibré notre circuit de mesure. La figure 15 nous montre la valeur que l'on doit ajouter à notre lecture pour obtenir la valeur véritable de capacitance de notre membrane.

Pour mesurer la capacitance de notre membrane, nous effectuons deux mesures. L'une d'elle est prise avec le niveau d'eau sous le trou, ce qui nous donne la mesure de la capacitance du film de téflon. L'autre est prise lorsque la membrane est formée, celle-ci comprend alors les valeurs de capacitance du film et de la membrane. Lorsque nous avons deux condensateurs en parallèle, la

valeur du condensateur équivalent est donné par $C_{eq}=C_1+C_2$. Ainsi, une simple soustraction nous permet d'obtenir la valeur de la capacitance membranaire.

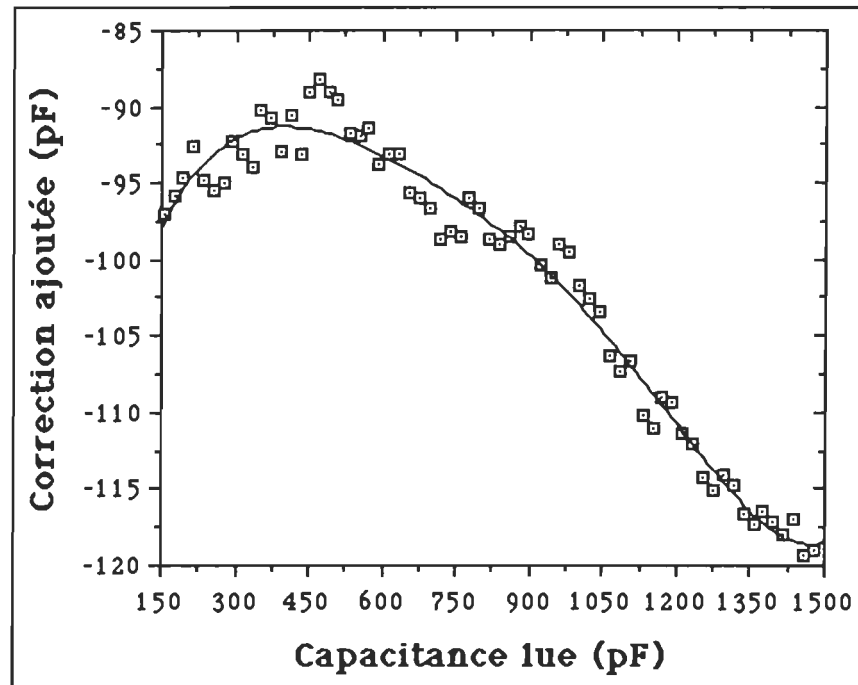


Figure 15. Calibration du circuit de capacitance

2.1.4.3. Résistance

Le diagramme du circuit de mesure de résistance est montré à la figure 16 et est représenté par l'indicatif 'AA' à la figure 5. Il est incorporé dans le même appareil que le circuit de mesure de capacitance et on utilise les mêmes électrodes que pour la mesure de capacitance. Pour pouvoir passer d'un circuit de mesure à l'autre, un commutateur en téflon est installé à l'entrée des électrodes. Il est important que ce commutateur soit fabriqué à l'aide de ce matériau car ainsi, les problèmes de décharges électrostatiques, qui surviennent lorsque l'on com-

mute deux circuits, sont éliminés. En effet, ces décharges sont suffisamment importantes pour provoquer une rupture électrique de la bicouche lipidique.

Les mesures de résistance sont effectuées en appliquant une tension variant entre 10 et 300 mV DC (le plus souvent 100 mV) au travers d'un diviseur de tension formé d'une part par la résistance propre de la membrane, représentée par R_m , et d'autre part par la résistance de 1,96 G Ω située à l'entrée négative de l'amplificateur opérationnel 1702-01. En mesurant la chute de tension au travers de la résistance, il est possible de calculer R_m . L'amplification nécessaire à la détection du signal est assurée par la résistance de 105,3 G Ω placée en feed-back.

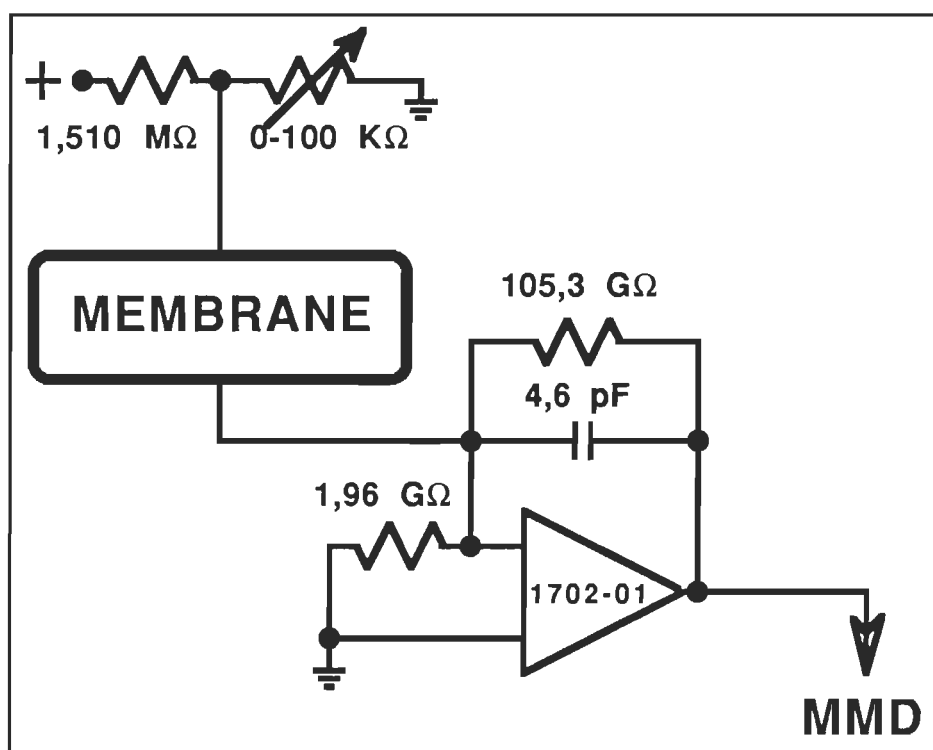


Figure 16. Circuit de mesure de résistance

Les valeurs de résistance des électrodes sont de l'ordre de $10\text{ k}\Omega$ et sont donc négligeables, les résistances mesurées pour les membranes étant de plusieurs ordres de grandeur plus élevées. Si la valeur de résistance membranaire devient plus élevée, c'est-à-dire de l'ordre de $200\text{ G}\Omega$ et plus, il faudra alors considérer R_m comme étant en fait la résistance équivalente provenant de R_m et R_f mises en parallèle. La valeur de résistance équivalente de deux résistances en parallèle nous est donnée par $R_{eq}^{-1} = R_1^{-1} + R_2^{-1}$. L'enregistrement en fonction du temps de la résistance se fait graphiquement sur un enregistreur X vs T (Pedersen, modèle 27MR, Walnut Creek, Californie) (fig. 5.EE). L'étalonnage de ce circuit de mesure de résistance, présenté à la figure 17, est effectué en utilisant des résistances de précision (Victoreen Inc., Cleveland, Ohio). Cet étalonnage nous permet de convertir directement la tension que l'on mesure à la sortie de l'amplificateur 1702-01 (V_0) en une mesure de résistance (R).

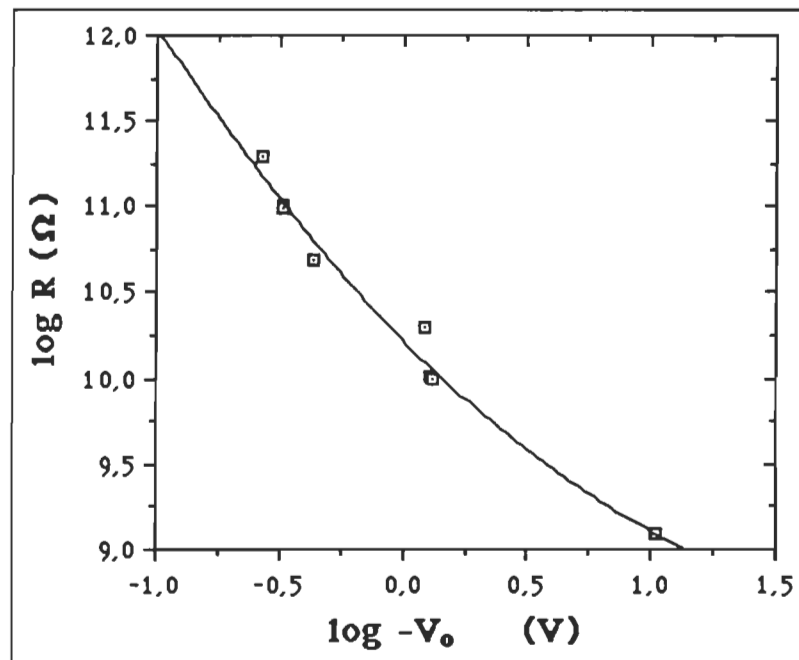


Figure 17. Calibration du circuit de résistance

Section 2.2. Reconstitution membranaire

2.2.1. Produits utilisés pour les bicouches

2.2.1.1. Produits utilisés

Les bicouches asymétriques furent reconstituées en utilisant des phospholipides comme matrice lipidique. Ce sont des molécules amphiphiles possédant une tête polaire et une partie aliphatique. Les lipides utilisés furent la phosphatidylsérine (PS, cerveau de bœuf, Pharmacia-PL Biochemicals, Milwaukee, Wisconsin) et la phosphatidyléthanolamine (PE, cœur de bœuf, Serdary Research Laboratories, London, Ontario) et leur structure est montrée à la figure 18.

Les chaînes aliphatiques des lipides sont représentées par R_1 et R_2 , et leur composition sera détaillée dans la section 2.2.1.3 (Purification, identification). La PS est négativement chargée au pH utilisé pour les expériences alors que la PE est électriquement neutre (Sackmann (1983)).

La chlorophylle a, dont nous pouvons voir la structure détaillée à la figure 19, provient soit de l'algue *Anacystis nidulans*, soit des épinards (dans les deux cas, Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri). La chlorophylle a est composée d'un anneau porphyrique auquel est attachée une queue phytyle. Lors de notre étude la chlorophylle a a servi comme donneur d'électron dans nos bicouches lipidiques.

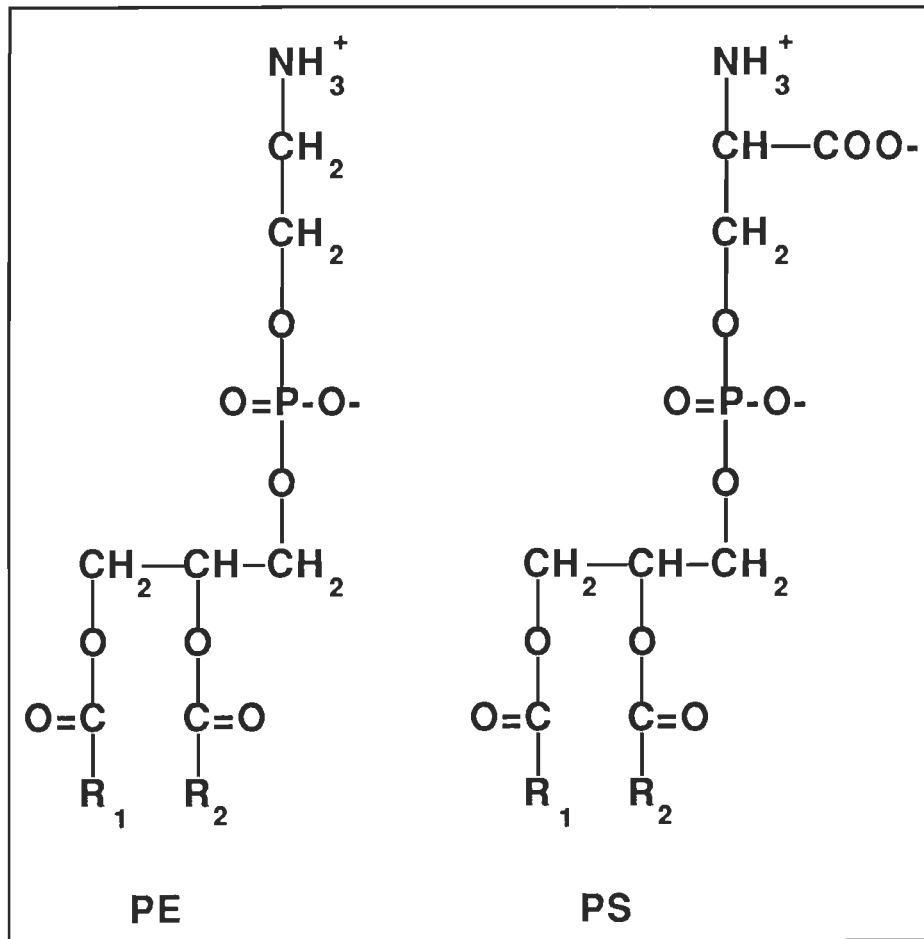


Figure 18. Structure des phospholipides

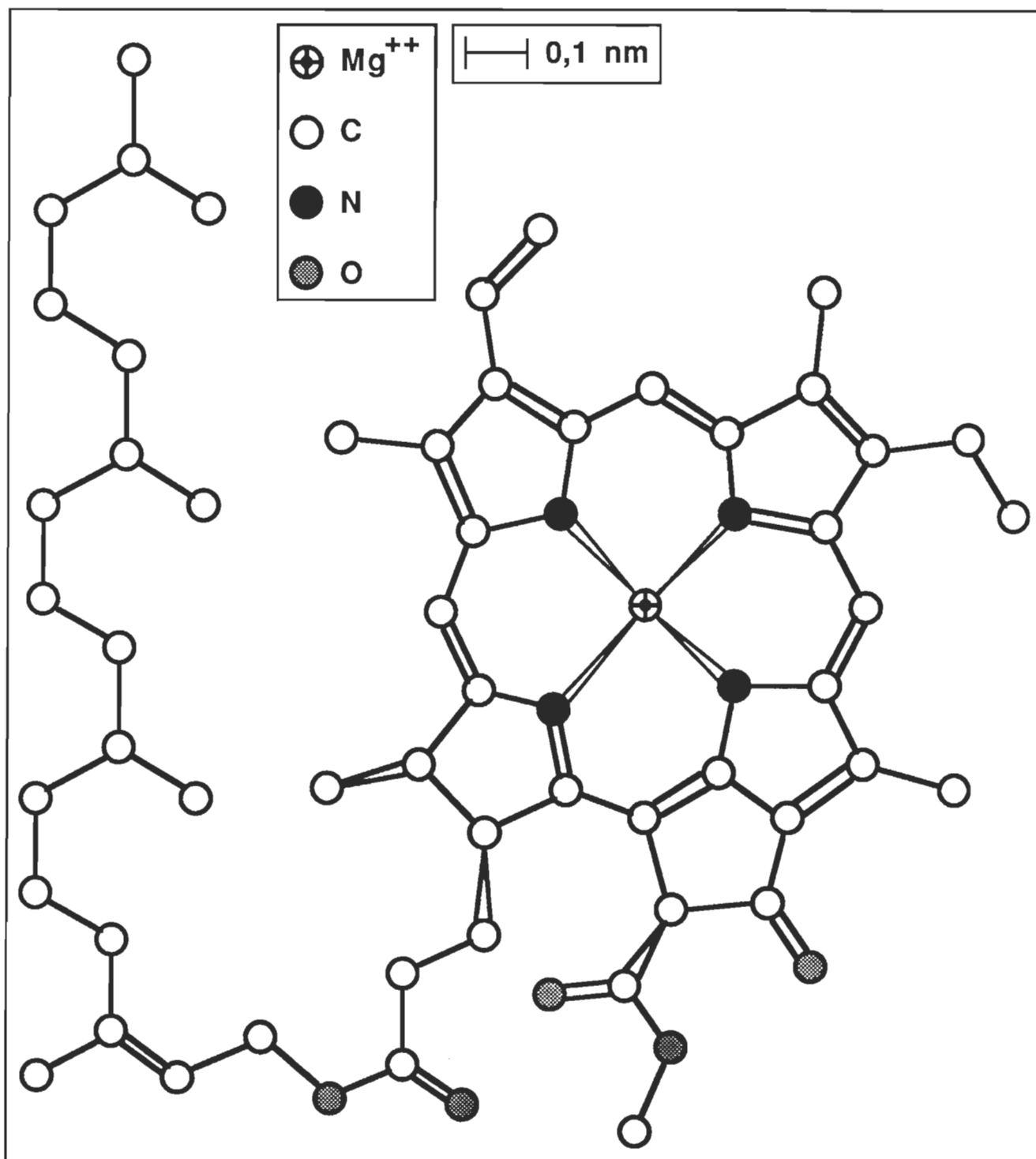


Figure 19. Structure de la chlorophylle **a**

Le bromure de diméthyl-distéaryl ammonium (DMDSAm) fut acheté chez Eastman-Kodak (Rochester, New York). Ce produit nous a servi à charger positivement les bicouches lipidiques dans lesquelles il a été incorporé. L'accepteur d'électron que nous avons utilisé est la plastoquinone-9, dont la structure est présentée à la figure 20. Celle-ci est gracieusement fournie par la compagnie Hoffman La Roche (Bâle, Suisse).

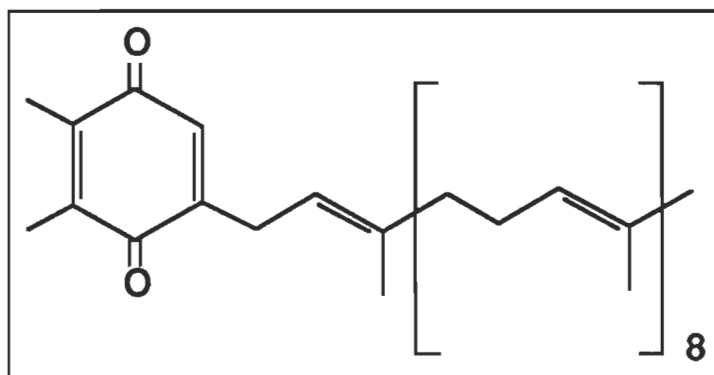


Figure 20. Structure de la plastoquinone-9.

Ces produits sont déposés à l'interface argon-eau en utilisant un mélange de dépôt hexane/éthanol (9/1, v/v) (Cadenhead et Kelner, (1974)). L'hexane (BDH, Ville St-Laurent, Québec) et l'éthanol (Alcool de Commerce Limité, Gatineau, Québec) sont distillés sur une colonne Vigreux (Fisher Scientific, Montréal, Québec) de 30 cm de long avant d'être utilisés. De plus, ce mélange de solvants est idéal pour la dépôt en mono- ou multicouches, car il est moins dense que l'eau, immiscible avec cette dernière et très volatil.

Les différents produits furent pesés sur une électrobalance Cahn (Ventron Instrument Corporation, modèle RG 2000, Cerritos, Californie) sous atmosphère inerte, l'azote dans ce cas-ci. Les vials sont fermés à l'aide de valve Mininert

(Pierce Chemical, Rockford, Illinois) qui nous permettent de prélever des échantillons de solutions sans provoquer de pertes par évaporation (on se rappellera la volatilité des solvants).

Le squalène ($C_{30}H_{50}$) (Eastman Kodak Company, Rochester, New York) utilisé pour conditionner le pourtour du trou dans le film de téflon est en solution (6% v/v) dans l'hexane. Le choix d'un tel produit est basé sur les travaux de White (1978). Cet auteur a montré que la formation des bicouches est facilitée par un pré-traitement de la partition de téflon par un agent oléophile, cet agent étant partitionné (White, 1978) vers la périphérie de la membrane lorsque celle-ci est formée. De plus, cet agent ne modifie en aucune façon le comportement de la chlorophylle a lorsque celle-ci est incorporée dans la bicouche (Stillwell et Tien, 1977).

2.2.1.2. Traitement, conservation

Les solutions lipidiques sont préparées dans des vials en verre préalablement nettoyés avec une solution de No-Chromix (Godax Laboratories, New York, New York). Elles sont conservées au congélateur (-20°C) à l'obscurité pour éviter toute dégradation thermique et/ou photochimique. Les mélanges qui contiennent de la chlorophylle a sont conservés à sec, sous atmosphère d'argon, dans un thermos (Union Carbide, Pointe-aux-Trembles, Québec) contenant de l'azote liquide (-196°C). Ces procédures sont nécessaires car, en solution, la chlorophylle a ne se conserve que deux ou trois heures; après, il y a apparition de produits de dégradation très difficiles à séparer (Hinninen et Ellfolk 1973, Sato et Murata 1978, Omata et Murata 1979, Richard 1985).

2.2.1.3. Purification, identification

La pureté tensio-active des solvants utilisés est vérifiée sur un bain de Langmuir classique. Pour les lipides, nous procédons tout d'abord par une chromatographie sur couche mince sur gel de silice. Les solvants d'élution sont $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}$ (25/15/4/2) pour la PS et $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65/25/4) pour la PE. Les patrons d'élution correspondent à ce que l'on retrouve dans la documentation et un seul spot est visible sur la plaque (Stahl, (1969)). Des tests effectués avec des réactifs spécifiques sur les plaques nous indiquent qu'il s'agit bien des produits supposés (Stahl, (1969)).

Une analyse chromatographique en phase gazeuse nous indique que la majorité des chaînes sont de 18 ou 20 carbones de long. Aussi, on retrouve 32,6% de chaînes saturées dans la PE pour 35,9% dans la PS. Grâce à cette analyse des chaînes grasses des lipides, nous avons pu déterminer les poids moléculaires de la PE et de la PS qui sont de 749,3 et 794,8 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ respectivement.

La pureté de la chlorophylle a est vérifiée par chromatographie sur plaques de sucrose en utilisant une solution de 1% de propanol-2 dans l'éther de pétrole (Sahlberg et Hinninen, 1984). De plus, nos échantillons de chlorophylle a rencontrent le critère de pureté standard couramment admis, i.e. un spectre d'absorption pris entre 400 et 750 nm.

La plastoquinone et le DMDSAm ont été vérifiés sur couche mince de silice en utilisant $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$ (99/1) (Stahl, (1969)) et $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (75/22/3) (Stahl, (1969)) respectivement comme solvant d'élution. Les chromatographies n'ayant montré qu'un seul spot, aucune purification subséquente ne fut entreprise.

2.2.2. Sous-phases

Les lipides ou les mélanges lipides-pigments sont déposés sur une sous-phase constituée d'un tampon borate-HCl d'une concentration de 10^{-3} M et d'un pH de $7,6 \pm 0,1$. A ce tampon est ajouté soit du NaCl, soit du NaCl et du CaCl_2 , la force ionique totale étant maintenue à 100 mM. Le Ca^{++} est utilisé, puisque nous voulons étudier ultérieurement l'effet de masquage des charges de surface à l'aide d'ions Ca^{++} . La concentration de ces ions est de 10 mM. Le NaCl est alors ajouté pour maintenir une force ionique constante de 100 mM.

Les sels (NaCl , CaCl_2 , $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) sont de qualité "Baker Analyzed Reagents" (Canlab, Montréal, Québec), d'une pureté >99%, et ont été utilisés sans purification. L'eau utilisée est purifiée par un système de filtration à haute pureté (Sybron/Barnstead Nano-Pure, Boston, Massachusetts) et distillée sur un appareil à distiller (double distillation) en quartz (Hereaus, modèle BI 18, Amersil Inc., Sayreville, New Jersey). La résistivité spécifique de l'eau ainsi obtenue est plus grande que $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ et la tension de surface est supérieure à $71 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$.

Les solutions tamponnées sont barbotées à l'argon pour diverses raisons. En particulier, cette opération empêchera que l'oxygène dissout dans l'eau n'oxyde les chaînes aliphatiques des lipides et/ou la chlorophylle a. De plus, nous savons que l'oxygène moléculaire est un excellent quencher de fluorescence. Un calcul rapide nous permet d'évaluer la solubilité de l'oxygène dans l'eau à 25°C . En utilisant la loi de Henry, nous établissons que cette solubilité est d'environ $3,2 \cdot 10^{-4} \text{ mole} \cdot \text{litre}^{-1}$. Le volume des bassins que nous utilisons est d'environ 100 ml, ce qui nous donne environ $3 \cdot 10^{-5} \text{ mole}$ de $\text{O}_{2(\text{aq})}$. Cette quantité est 60 000 fois plus grande que la quantité de Chl a déposée à l'interface, d'où la nécessité de

chasser l'oxygène du milieu autant que possible.

2.3. Méthodologie

2.3.1. Expérience type

Passons succinctement sur la méthodologie que nous allons utiliser tout au cours de nos expérimentations.

Le porte-membrane et le bain sont préalablement lavés à l'éther, puis avec un mélange $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (1/1) (Hansen, (1978)). Après l'assemblage, l'insertion du tampon et la saturation de l'atmosphère en argon, nous procédons au nettoyage de la surface pour enlever toute trace résiduelle de produit tension-actif. L'étanchéité électrique du double-bain est alors vérifiée à l'aide du circuit de résistance, et celle-ci se doit d'être supérieure à $500 \text{ G}\Omega$.

Lors des expériences de reconstitution membranaire, les réactions qui se produisent à l'intérieur de la bicouche sont enregistrées simultanément sur deux fronts: l'enregistrement de la résistance et il a aussi la prise de spectres de fluorescence. Lorsque la prise du spectre est terminée, on coupe l'illumination laser et on continue d'enregistrer la résistance. Il est quelquefois possible, bien que difficile, d'obtenir des mesures de capacitance, car changer de circuit provoque souvent une décharge électrostatique qui fait éclater la bicouche. Si possible, nous procédons à une seconde illumination, en suivant la même procédure d'enregistrement. Après un certain temps, nous faisons éclater volontairement la bicouche en la court-circuitant, puis nous enregistrons les données de base tels la résistance des électrodes et le spectre de fluorescence du matériel demeurant à l'interface.

Cette procédure nous permet ainsi de mettre en évidence la fluorescence du pigment incorporé dans la bicouche en enlevant la contribution au spectre total due au matériel présent à l'interface tout au long de l'expérience. Il est en effet impossible de construire une bicouche et d'enlever le matériel demeurant à l'interface, celui-ci étant nécessaire au maintien de la tension de surface du film.

2.3.2. Résultats types

La figure 21 présente un enregistrement typique d'une expérience. Il s'agit d'un enregistrement de la résistance (conductance). Plus la tension de sortie est élevée, plus la résistance est faible et par conséquent, la conductance élevée. Le système de reconstitution membranaire utilisé dans cet exemple est le suivant: d'un côté, un mélange PE:PQ-9 (9:1, mol:mol) et de l'autre un mélange PE : PS : Chl a (9:9:2, mol:mol:mol). Cette expérience s'est effectuée sur sous-phase ne contenant que du NaCl et la force ionique est de 100 mM.

Nous pouvons voir que la conductance varie immédiatement lorsque l'illumination débute à trois minutes. Lorsque le laser est coupé, la conductance recommence immédiatement à chuter. Lors de l'illumination, elle avait précédemment augmenté d'un facteur quatre; elle diminue alors à environ deux fois sa valeur initiale. Nous pouvons rallumer le laser, la conductance augmente de nouveau. Lorsque nous refermons le laser, la conductance recommence à chuter, mais plus lentement et sans atteindre la valeur de base. Une troisième illumination laser ne permet pas de faire augmenter de beaucoup la conductance, et lorsque celui-ci est coupé, la conductance ne varie plus.

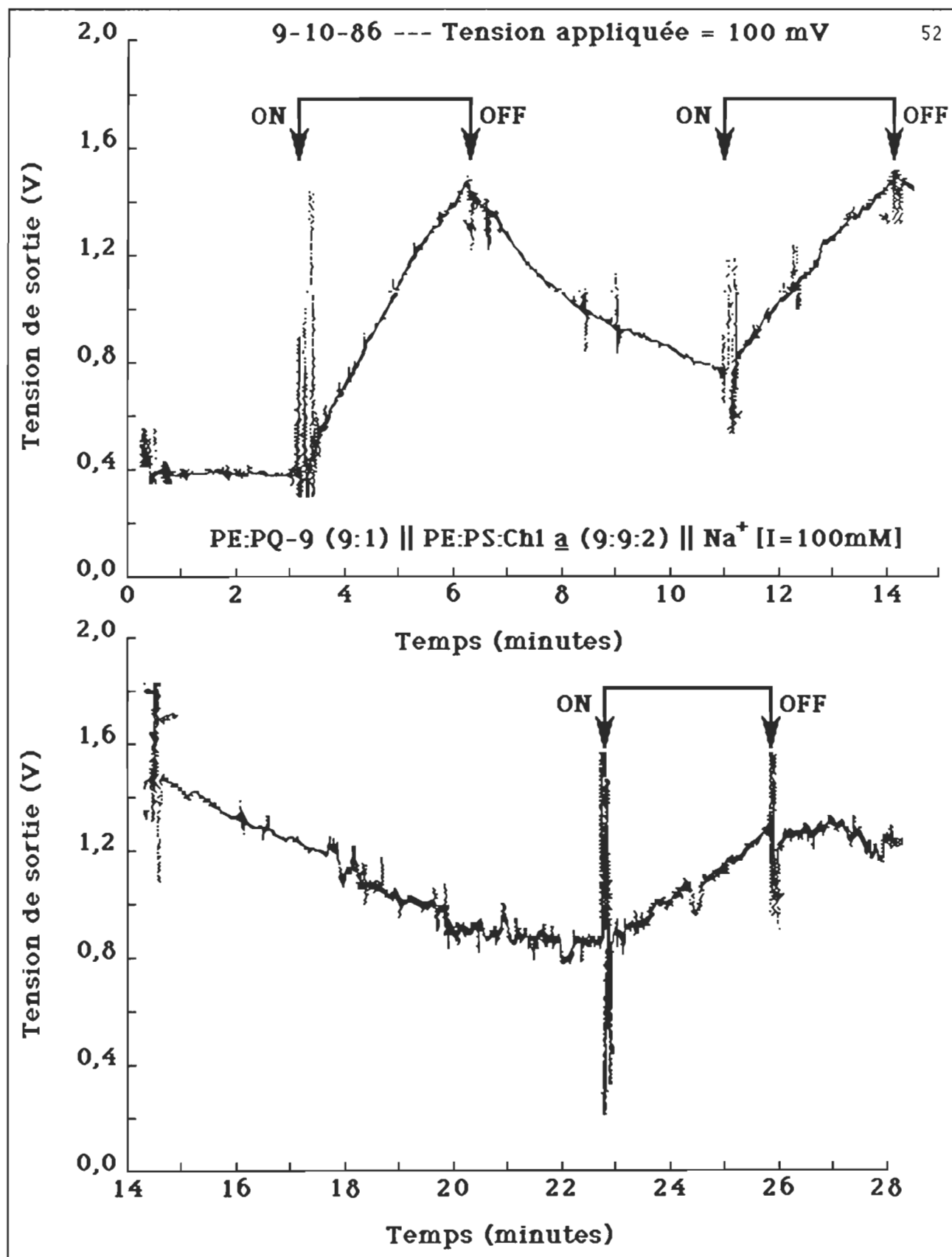


Figure 21. Enregistrement typique d'une mesure de résistance

La figure 22 présente deux spectres de fluorescence qui ont été pris lors de ces illuminations successives. Le spectre -U11A correspond au signal de fluorescence émis par la bicouche et le film à l'interface lors de la première illumination (fig. 21, 3,5 à 6,5 min). Le spectre -U11D correspond au signal émis par le film seul à l'interface après qu'il n'y ait plus de membrane, i.e. après 30 minutes. Quant au spectre -U11A-D, il correspond au **spectre de différence** entre les deux précédents.

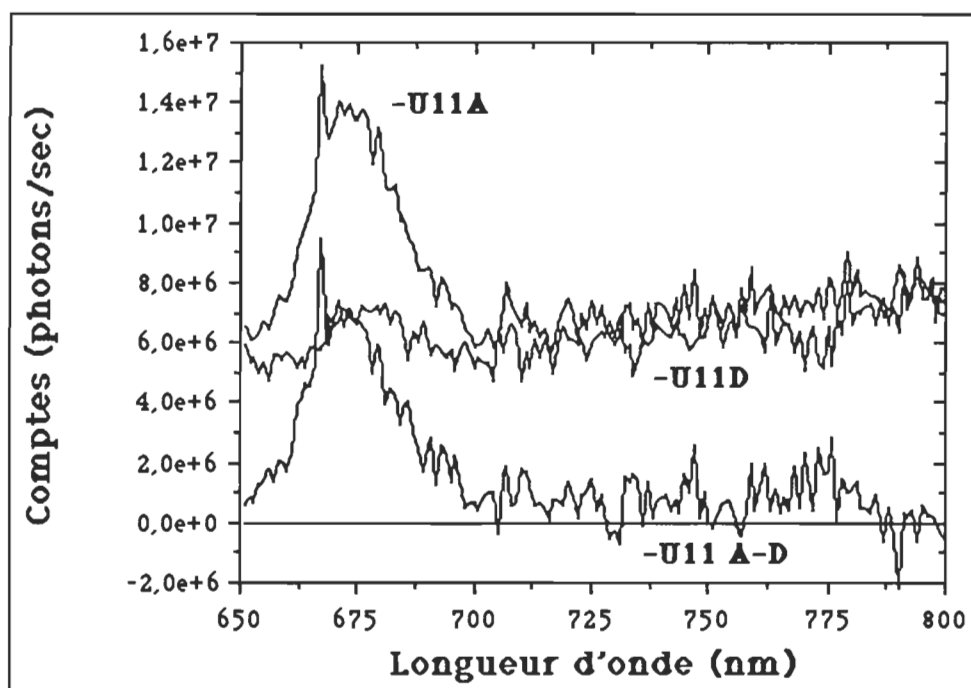


Figure 22. Spectre de fluorescence typique

Chapitre 3. Résultats et Discussion

Le présent chapitre comprend les analyses qui ont été effectuées à l'aide des résultats que nous avons obtenus en laboratoire. Ce chapitre est divisé en trois sections principales qui traiteront successivement des caractéristiques de stabilité et de reproductibilité des bicouches, de l'étude que nous avons faite en faisant varier le rapport lipide/chlorophylle a dans nos bicouches, et de l'étude de l'influence des charges de surfaces sur l'efficacité de transfert d'électron entre la chlorophylle a et la plastoquinone-9.

Section 3.1. Caractéristiques de stabilité et de reproductibilité des bicouches lipidiques

Dans l'introduction de ce travail, nous avons vu que les bicouches planes reconstituées à l'aide de la technique de Müller-Montal possèdent une grande stabilité dans le temps en ce qui a trait au phénomène d'inversion des lipides de part et d'autre de la membrane (c.f. section 1.2.6.). Il existe toutefois un autre genre de stabilité qui, pour nous, est important: la stabilité mécanique dans le temps. En effet, pour qu'une bicouche soit "utilisable" pour notre étude, il faut que ses propriétés électriques de capacitance et de résistance ne varient pas de plus de 5% dans un laps de temps de 20 minutes et ce, avant que nous effectuions nos mesures de transferts d'électrons. Lorsque nous expérimentons à l'aide de bicouches composées seulement de phospholipides, la stabilité, électrique et mécanique, observée est de beaucoup supérieure à nos exigences de base. En effet, dans ces cas, les propriétés de capacitance et de résistance varient dans un écart de $\pm 1\%$ durant des temps excédant 1 heure. Cependant, dès que nous incorporons autre chose que des phospholipides (e.g. la Chl a, la PQ-9, le DMDSAm),

les bicouches deviennent plus instables et durent moins longtemps, parfois même se brisant toutes seules en moins de 10 minutes. Montal, White et Ti Tien (Montal et Müller (1972), White et coll., (1976), White (1978, 1986), Ti Tien (1982), Kutnik et Ti Tien (1983)) maintiennent depuis longtemps dans leurs nombreux articles que les bicouches lipidiques reconstituées, soit à l'aide de la technique de Müller-Montal, soit à l'aide de celle des BLM, sont des systèmes en équilibre dynamique avec un réservoir de lipides (torus dans le cas des BLM et film demeuré à l'interface dans le cas des membranes Müller-Montal). Les mesures de stabilité temporelle que nous avons effectuées apportent un élément de réponse qui va en ce sens. En effet, cet équilibre dynamique implique que les différentes compositions relatives des divers produits (lipides) présents dans la bicouche vont varier de façon stochastique. Etant donné que les caractéristiques électriques (moment dipolaire, charge) varient d'un type de molécule à l'autre, il peut en résulter que, localement, nous obtenions la formation d'agrégats dont les propriétés soient suffisamment différentes pour forcer ces agrégats à s'éloigner les uns des autres. Ceci pourrait provoquer des tensions mécaniques suffisantes pour causer la rupture de la bicouche.

Ceci nous amène à parler de la reproductibilité des mesures effectuées à l'aide des différents films déposés à l'interface. Ainsi, lorsque nous travaillons avec des films constitués de lipides "purs", la microcomposition du film de lipide près de l'ouverture au moment de préparer la bicouche n'a pas d'importance puisqu'il est impossible d'obtenir des agrégats séparés de molécules distinctes. Les fluctuations observées sur les mesures électriques proviennent des caractéristiques de la zone de transition, le torus. Ainsi, lors de la formation de la bicouche, Brullemans et Tancrede (1987) ont montré que le torus, constitué de micelles inverses, influence de façon importante les mesures des propriétés électriques de ces bicouches, faisant varier par exemple les valeurs de capacitance mesurées de

l'ordre de 5 à 7%.

Toutefois, lorsque nous travaillons avec des films constitués de mélanges lipidiques, en plus de la fluctuation des valeurs causée par la présence du torus, s'ajoute le problème de l'ignorance de la microcomposition exacte du film à l'interface. Il existe, sans doute, des microdomaines de compositions différentes qui ne seront jamais les mêmes d'une expérience à l'autre. Ceci résulte du fait que pour réussir à fabriquer des bicouches par la technique de Müller-Montal, nous devons déposer à l'interface une quantité de lipides correspondant à environ deux fois ce qui doit être déposé pour faire une monocouche. Or, il est fort probable qu'aux pressions de surface correspondant à cette situation physique, le film contiendra des microdomaines de compositions différentes qui ne seront sans doute pas les mêmes d'une expérience à l'autre. Pour se convaincre de ceci, il suffit par exemple de se référer aux travaux de Tanocrède et coll. (1981, 1982) qui ont montré que des mélanges aussi simples que la dioléoyl-L- α -phosphatidylcholine et le tout-trans rétinol demeurent immiscibles à l'interface à une pression de surface supérieure à celle de la pression de transition et inférieure à celle du collapse final du film. La présence de ces microdomaines à l'interface augmentera par conséquent le taux de fluctuation de nos mesures puisque nous ne pourrions pas contrôler la microcomposition précise du film, près de l'ouverture, qui servira à former la bicouche. Cet inconvénient de la technique de reconstitution que nous avons choisie prévaut également pour la méthode des BLM puisque dans ce dernier cas, nous ne savons absolument rien de la façon dont les constituants formant la bicouche vont se partitionner entre la zone de transition (extrêmement importante en volume, dans ce cas) et la bicouche. Au risque de nous répéter, il faudra se souvenir que les fluctuations joueront un rôle important dans l'analyse ultérieure de nos résultats.

Section 3.2. Etude en fonction du rapport lipide/chlorophylle a

Pour débiter notre étude, nous avons déterminé les proportions des différents mélanges (PE, PS, Chl a, PQ-9, DMDSAm) que nous devons utiliser pour effectuer nos expériences de reconstitution membranaire. Pour pouvoir ultérieurement comparer nos résultats avec certaines études sur les vésicules et les BLM que l'on retrouve dans la documentation, nous avons établi, en particulier sur la base des travaux de Fang et Tollin (1983, 1984) et de Ford et Tollin (1982, 1983, 1986), que la quantité de PQ-9 présente dans les bicouches serait maintenue constante à 10% (mol). Ensuite, nous avons dû déterminer la proportion de Chl a à utiliser et pour ce faire, nous avons effectué une étude de fluorescence de la Chl a incorporée dans des bicouches en faisant varier le rapport lipide/chlorophylle a entre des valeurs extrêmes de 9:1 et 50:1 (mol:mol).

3.2.1. Propriétés de fluorescence de la Chl a dans les bicouches

Pour débiter notre étude de fluorescence, nous avons commencé par reproduire une partie de l'étude de Beddard et coll. (1976) qui a trait à l'extinction de fluorescence de la Chl a dans les milieux lipidiques. En travaillant avec des vésicules et des liposomes constitués de phosphatidylcholine et de galactolipides, ces chercheurs ont démontré que si le rapport lipide/chlorophylle est maintenu supérieur à 50, il ne se produit pas de phénomène d'auto-extinction ("quenching") de fluorescence. Toutefois, si ce rapport diminue, les rendements quantiques de fluorescence diminuent rapidement et deviennent presque nuls à un rapport lipide/chlorophylle d'environ 5. Ces chercheurs ont aussi mesuré des maxima d'émission de fluorescence, λ_{\max} , situés à 677 nm. Les auteurs soulignent aussi que ce λ_{\max} démontre que la Chl a se situe dans un environnement

similaire, du point de vue spectroscopique, à celui que l'on retrouve dans les chloroplastes. Aussi leurs études par ESR ont démontré que la Chl a ne se trouvait jamais dans des états agrégés (dimères, trimères, ...) et ce, même à des concentrations de 3 lipides/chlorophylle. Les effets d'extinction de fluorescence sont donc dus, selon Beddard, à des effets de concentration et non à des effets de formation d'agrégats (dimères, trimères, etc.).

Nous avons donc effectué des expériences de reconstitution membranaire en utilisant un mélange PE:PQ-9 (9:1, mol:mol) d'un côté de la bicouche et un mélange PE:PS:Chl a (25:25:1, mol:mol:mol) de l'autre. Il est à noter ici qu'il a été impossible de construire des bicouches ne contenant qu'un mélange PS:Chl a (Robert et coll., 1985), et c'est pourquoi nous avons utilisé un mélange PE:PS:Chl a. Nous avons alors observé des spectres d'émission de fluorescence provenant de la Chl a et possédant un λ_{\max} situé à 671 ± 6 nm (voir figure 22). Il est à remarquer que le bruit de fond présent sur les spectres de fluorescence introduit une variation du λ_{\max} d'un spectre à l'autre (se référer à la figure 22 pour la qualité du rapport signal/bruit). Toutefois, tout au long de ces expériences, aucun transfert d'électron ne fut observé, dû sans doute à la quantité trop faible de Chl a incorporée dans la bicouche. Nous avons alors tenté de provoquer des transferts d'électrons en augmentant la quantité de Chl a contenue dans nos bicouches. A un rapport de 20 lipides par chlorophylle, un λ_{\max} de 677 ± 6 nm a été observé; ce λ_{\max} étant déplacé à 683 ± 9 nm en utilisant un rapport de 9 lipides/chlorophylle. A ces deux concentrations toutefois, nous obtenions des transferts d'électrons aisément mesurables, les expériences conduites avec 9 lipides/chlorophylle nous donnant les transferts les plus importants. En utilisant ces concentrations de Chl a, cependant, nous avons noté le phénomène d'auto-extinction de fluorescence, tel

que rapporté antérieurement par Beddard et coll. (1976) et dont nous avons discuté ci-haut. Nous étions donc confrontés au dilemme d'utiliser une concentration plus élevée de Chl a que ne le permettait les études de fluorescence dans le but d'obtenir des transferts d'électrons aisément mesurables, ou encore demeurer dans les limites imposées par les études d'extinction de fluorescence et espérer que nous puissions obtenir des transferts d'électrons parfois mesurables. Nous avons opté pour la première solution et nous avons décidé d'effectuer nos expériences de reconstitution membranaire en utilisant un rapport de 20 lipides par chlorophylle. Le choix de ce compromis nous permettra ainsi d'obtenir des effets de transferts d'électron mesurables aisément, sans pour autant perdre toute l'information de fluorescence, les pertes dues à l'auto-extinction de la Chl a étant moins importantes que si nous avions utilisé un rapport de 9 lipides/chlorophylle.

Observons maintenant les résultats spectroscopiques que nous avons obtenus en faisant varier ce rapport lipide/chlorophylle.

Nous allons débiter en comparant les résultats concernant les maxima d'émission de fluorescence que nous avons mesurés avec les divers résultats que l'on retrouve dans la documentation. Nous observons expérimentalement que nous obtenons une variation du λ_{\max} en fonction du rapport lipide/chlorophylle. Lorsque nous "diluons" la Chl a dans les lipides, en passant d'un rapport 9/1 à un rapport 50/1, la position du λ_{\max} passe de 683 ± 9 nm à 671 ± 6 nm. Des études en solution dans des solvants de polarités différentes (Singhal et coll., (1968), Evesi et Singhal (1969)) ont montré que la position du λ_{\max} de fluorescence reflète l'environnement dans lequel se retrouve la Chl a. Ces auteurs rapportent qu'un λ_{\max} situé aux environs de 668 nm est observé en présence de solvants peu

polaires (e.g. éther diéthylique, $\epsilon=4,3$, isopentane, $\epsilon=2,0$) alors que des solvants plus polaires (e.g. éthanol, $\epsilon=24,3$, méthanol, $\epsilon=32,6$) font se déplacer le λ_{\max} aux environs de 673 nm. D'autres chercheurs (Chapados et coll., (1984)) ont rapporté un λ_{\max} de 674 nm pour la Chl a en solution dans le benzène ($\epsilon=2,3$), un solvant très peu polaire, et un λ_{\max} de 678 nm pour la Chl a dispersée en monocouches avec de l'alcool oléique (cis octadécène-9 ol-1). Par ailleurs, de Wilton et coll., (1982) et de Wilton et Koningstein (1983) ont démontré qu'en solution, un λ_{\max} situé à 668 nm est associé à de la Chl a existant sous forme de monomères. Ces derniers ont aussi démontré que lorsqu'un pic apparaît à 688 nm, celui-ci indique la présence de dimères de Chl a. Toujours selon de Wilton et Koningstein, les dimères de chlorophylle, (Chl a)₂, sont observables seulement en solution dans des solvants non-polaires et absolument anhydres. Cette assertion est corroborée par Katz et coll. (1978) qui soutiennent que la présence de (Chl a)₂ est impossible dans des solvants polaires ou provoquant des liaisons hydrogène nucléophiles (e.g. éthanol, eau).

A la lumière de ce qui précède, nous pouvons donc tirer les conclusions suivantes concernant l'incorporation de la Chl a dans les bicouches lipidiques: la Chl a est incorporée dans les bicouches lipidiques sous forme de monomères, et les effets spectraux d'extinction de fluorescence et de déplacement du maximum d'émission observés ne sont pas causés par la présence de dimères de chlorophylle (Chl a)₂. Ainsi, lorsque nous incorporons moins de Chl a, chaque molécule de Chl a, compte tenu de la grande dilution de ces dernières, devient majoritairement entourée de molécules de phospholipides. La valeur de λ_{\max} , dans ce cas environ de 671 nm, correspond alors, si on se fie aux travaux en solution, à ima-

giner la Chl a dans un milieu de constante diélectrique dont la polarité est de l'ordre de 25 à 35. Or, cette gamme de valeurs de constantes diélectriques correspond à celle que l'on soupçonne d'exister au niveau des têtes polaires des lipides (Lessard et Fragata, (1986) en particulier la table 1. Lorsque la Chl a est diluée, la tête polaire de la Chl a se retrouverait donc en interaction avec les têtes polaires des lipides. Par contre, si la concentration de la Chl a est augmentée, le λ_{\max} passe maintenant à 683 nm, caractéristique d'un milieu environnant plus polaire. Par ces concentrations élevées de la Chl a, on imagine maintenant une molécule donnée de Chl a majoritairement entourée d'autres molécules de Chl a plutôt que de lipides et formant ainsi un microdomaine en contact avec la phase aqueuse (polarité plus élevée). Ce microdomaine est cependant constitué de **monomères** de Chl a, la polarité du milieu étant défavorable à la formation de dimères ou d'oligomères. La tête polaire de la Chl a étant maintenant en contact plus grand avec la phase aqueuse, le λ_{\max} serait ainsi déplacé vers les grandes longueurs d'onde.

Ce comportement spectral de la Chl a dont nous venons de discuter et les conclusions que nous avons tirées concernant la polarité de l'environnement autour de l'anneau porphyrrique de la Chl a peuvent maintenant être confrontés aux modèles d'incorporation de la Chl a dans les bicouches que nous retrouvons dans la documentation. A ce sujet, on retrouve deux écoles de pensée, opposée l'une à l'autre (Anderson, (1975a, 1975b); Brasseur et coll., (1984)). Ces deux écoles de pensée sont toutefois d'accord sur un point : la chaîne phytyle de la Chl a est incorporée dans le corps même de la bicouche, au niveau des chaînes aliphatiques des lipides. La différence de conception concerne l'orientation de l'anneau porphyrrique. Selon les travaux d'Anderson, utilisant des résultats extraits d'expériences de dichroïsme et de polarisation de fluorescence de Chl a incorporée dans des bicouches lipidiques ou des membranes chloroplastiques (1975a, 1975b), la

Chl a est repliée sur elle-même au niveau du lien ester qui relie la chaîne phytyle à l'anneau. Ce repliement a pour effet de forcer l'incorporation de l'anneau porphyrique à l'intérieur même de la bicouche, la molécule adoptant la forme d'un 'V' tel que montré à la figure 23.

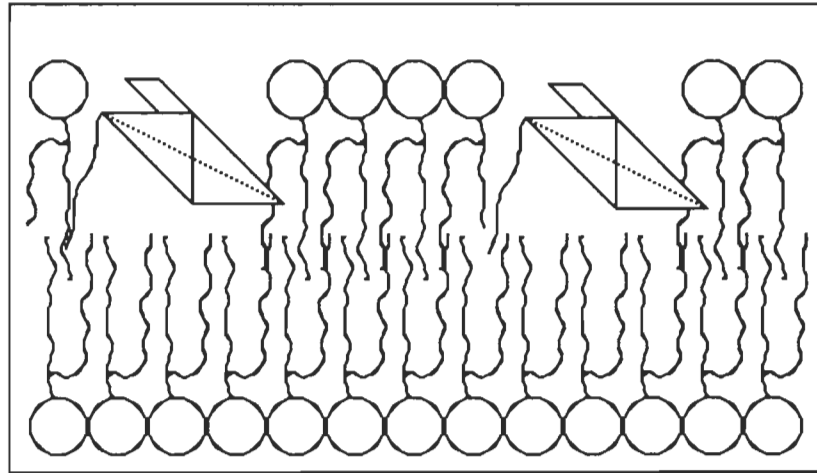


Figure 23. Modèle d'incorporation de la Chl a dans une bicouche, selon Anderson (1975a, 1975b)

Toutefois, selon les études théoriques de modèles conformationnels de Brasseur et coll. (1984), qui s'appuient sur les résultats expérimentaux d'incorporation de la Chl a dans des BLM et des vésicules, cette vision serait erronée. Selon Brasseur et coll., la Chl a n'est pas repliée sur elle-même, mais au contraire, l'anneau porphyrique est positionné vers la sous-phase, probablement au niveau des têtes polaires (voir figure 24). Ainsi positionné, l'anneau porphyrique devient alors plus exposé aux différents changements de polarité pouvant se produire au niveau des têtes polaires du lipide.

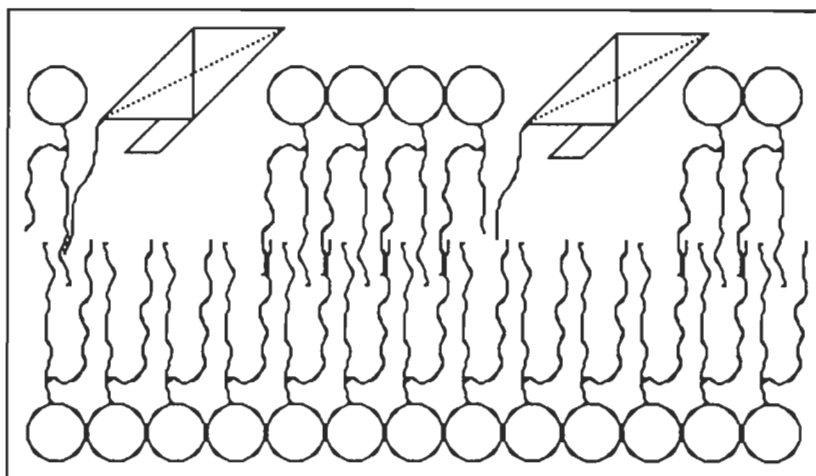


Figure 24. Modèle d'incorporation de la Chl a dans une bicouche, selon Brasseur et coll. (1984)

En regard de ces deux hypothèses et des résultats que nous avons présentés ci-haut, il est clair que le modèle d'Anderson résiste moins bien à l'analyse que celui de Brasseur et coll. En effet, le modèle d'Anderson n'est pas compatible avec les valeurs de constante diélectrique, de l'ordre de 25 à 35, que nos études spectroscopiques nous ont amené à proposer au sujet de la polarité de l'environnement de l'anneau porphyrrique de la Chl a. Ainsi donc, à la lumière de nos résultats expérimentaux et de ceux discutés plus haut concernant la position du λ_{\max} en fonction de la polarité du milieu, il semble donc que **la chlorophylle a s'incorpore dans les bicouches lipidiques selon le modèle proposé par Brasseur et coll. (1984), i.e. la chaîne phytyle dans la bicouche et l'anneau porphyrrique au niveau des têtes polaires des lipides**. Bien que ne formant pas à eux seuls une preuve solide et inattaquable de ce que nous proposons, nos résultats fournissent indéniablement un élément de réponse qui va dans le sens du modèle proposé par Brasseur et coll. (1984). De plus, comme nous le verrons plus loin dans la section 3.3.1., ces résultats

spectroscopiques vont dans le même sens que nos résultats de transferts d'électrons. Aussi, lorsque nous traiterons nos résultats concernant l'influence des charges de surface sur les efficacité de transferts d'électron, nous verrons que cette discussion sur la position de la Chl a dans les bicouches prend une grande importance si on cherche à comprendre par quel mécanisme s'effectue le transfert d'excitation.

3.2.2. Propriétés électriques des bicouches

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'étude du transfert d'électrons dans des membranes contenant une quantité fixe d'accepteur (i.e. PE:PQ-9, 9:1, mol: mol) et une quantité variable de Chl a (i.e. PE:PS:Chl a, 25:25:1, 10:10:1 ou 9:9:2, mol:mol: mol). Les résultats obtenus concernant les propriétés électriques de ces bicouches sont présentés dans les deux figures suivantes. Il faut mentionner ici qu'il n'a jamais été possible d'obtenir une variation de nos mesures électriques (résistance ou capacitance) de quelque ordre que ce soit si nous n'avions pas simultanément présence de la Chl a et de la PQ-9. Des expériences témoins n'utilisant pas l'un ou l'autre de ces deux composés nous ont prouvé, hors de tout doute, que l'absence d'un de ces deux composés ne conduit à aucune perturbation des propriétés électriques du type de celles que nous décrirons dans les paragraphes suivants. Il est donc clair que lorsque nous mesurerons des modifications électriques (résistance ou capacitance), nous serons assurés qu'elles seront imputables à un processus de transfert d'électron de la Chl a vers la PQ-9.

Nous pouvons voir à la figure 25 le comportement de la variation de la résistance spécifique mesurée pour les membranes en fonction du rapport lipide/chlorophylle. Lorsque nous parlons de mesures **spécifiques**, cela veut dire que les

valeurs de résistance, de conductance et de capacitance mesurées ont été corrigées pour tenir compte de la surface de la bicouche. Ces variations sont calculées en mesurant le changement de résistance par rapport à la valeur initiale de résistance prise immédiatement avant l'expérience (soit une illumination, soit un retour à l'obscurité). Dans cette figure, une variation de $R_{sp}=+100\%$ indique que la valeur de résistance est passée d'une valeur R à une valeur $2R$. Dans le même ordre d'idée, une variation de -50% indique une valeur de résistance qui est passée d'une valeur R à une valeur $R/2$. Cette convention sera aussi utilisée pour les graphiques de variation de conductance spécifique (S_{sp}) et de capacitance spécifique (C_{sp}). Dans cette figure, la courbe marquée **ON** représente le changement de résistance de la membrane lorsque nous l'illuminons, par rapport à une valeur initiale prise immédiatement avant illumination; la courbe dénommée **OFF** représente la variation de la résistance membranaire qui se produit après que nous ayons coupé l'illumination (environ 2 minutes après), par rapport à la valeur de résistance obtenue à la toute fin de l'illumination. Cette convention sera utilisée pour tous les graphiques subséquents de ce genre.

La figure 25 montre que lors de l'illumination (courbe **ON**), la résistance chute, ce qui nous indique qu'il y a un meilleur passage du courant et donc un transfert d'électron de la chlorophylle a vers la plastoquinone-9. Lorsque nous coupons l'illumination (courbe **OFF**), il y a augmentation de la résistance, c'est-à-dire un arrêt du transfert d'électron et un retour de la résistance membranaire tout près de sa valeur prise au début de l'expérience. Nous pouvons aussi remarquer que les variations de résistance sont nulles à un rapport lipide/chlorophylle de 50. Il semble alors que la faible quantité de chlorophylle incorporée dans les bicouches ne nous permette pas d'enregistrer le très faible courant résultant du transfert électronique du donneur vers l'accepteur. La figure 25 montre donc que les variations de résistance résultant du transfert électronique sont effectivement

mesurables et que par ailleurs elles deviennent de plus en plus importantes à mesure que nous augmentons la quantité de Chl a dans la bicouche (ou, alternativement, que nous abaissons le rapport lipide/chlorophylle).

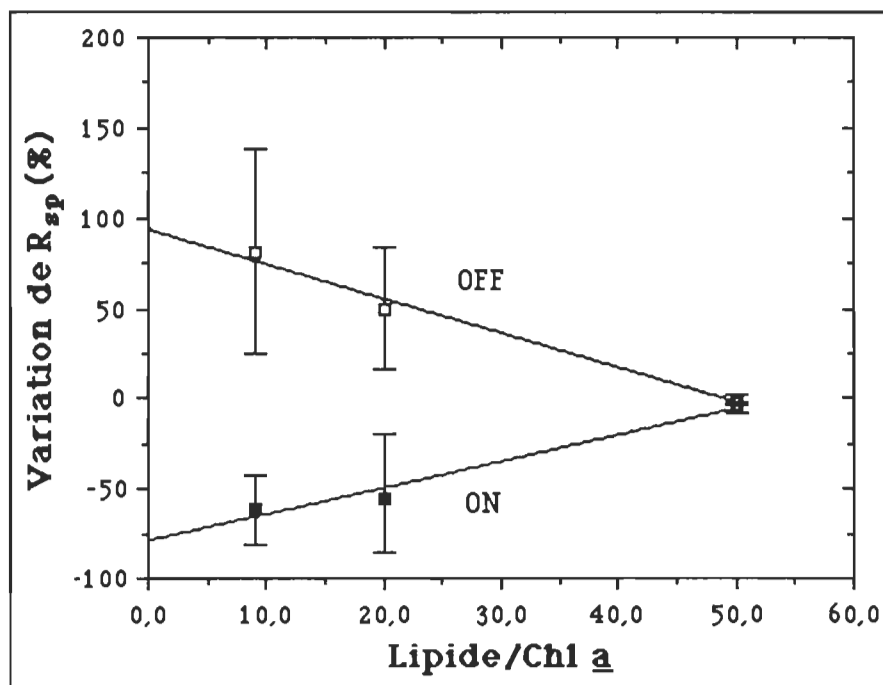


Figure 25. Variation de la résistance spécifique en fonction du rapport lipide/chlorophylle

Il est aussi à noter que dans la figure 25, comme dans tous les graphiques qui seront présentés ultérieurement, nous avons tenu à inclure tous les points expérimentaux obtenus pour lesquels nous n'avons aucune raison de douter de la qualité des bicouches formées. On remarque immédiatement la grande dispersité de nos mesures expérimentales pour certains systèmes, en général ceux pour lesquels plusieurs constituants sont utilisés pour reconstituer la bicouche. Il faut toutefois se rappeler, comme il a été fait mention dans l'introduction (section 1.2.6.) et au début de ce chapitre (section 3.1.), que les

fluctuations enregistrées reflètent les différences de microcomposition du film et que ces différences de microcomposition apportent des modifications dans le comportement électrique des bicouches. Dans nos graphiques, chaque point accompagné d'une barre d'erreur représente le résultat de mesures effectuées sur 20 à 30 membranes. Habituellement, nous retrouvons dans la documentation scientifique des articles rendant compte de résultats d'expériences obtenus par l'une des méthodes de reconstitution membranaire dont il est fait mention à la section 1.2., mais dont les auteurs présentent des conclusions en ne se basant que sur 2 ou 3 résultats expérimentaux. Il est impossible d'obtenir une interprétation crédible sur un si petit nombre d'expériences compte tenu des variations expérimentales dont elles sont le siège et dont nous avons discuté précédemment. En ce sens, notre façon de procéder diffère radicalement de celle que l'on rencontre dans la documentation, car nous avons tenu à inclure tous nos résultats expérimentaux; de là la grande variation observée sur nos résultats. Il eut été aisé de se conformer à la coutume que l'on rencontre dans la documentation mais nous avons choisi de ne pas le faire, pensant ainsi rendre nos résultats plus crédibles. Aucune technique de reconstitution n'étant parfaite, la dispersité des résultats obtenus par la technique de Müller-Montal constitue dès lors l'un de ses inconvénients majeurs.

Par ailleurs, ce qu'il importe de réaliser dans la figure 25 comme dans les autres graphiques que nous présenterons, ce n'est pas tant le fait que les valeurs fluctuent, mais bien le fait que pour certaines compositions de bicouches, il n'existe pas de valeurs correspondantes de R_{sp} (ou C_{sp} dans la figure suivante, le même raisonnement s'appliquant), bien qu'un recouvrement assez grand des barres d'erreurs soit enregistré. Pour bien comprendre, revenons à la figure 25. Observons la courbe marquée **OFF**. Pour des rapports lipide/chlorophylle de 9, 20 et 50 nous obtenons des variations de R_{sp} de 89 ± 56 , 50 ± 34 et $0,3 \pm 0,6$ % respec-

tivement. Ce qu'il faut noter ce n'est pas l'importance de ces écarts, mais bien que, par exemple, pour un rapport de 20, aucune expérience n'a donné de résultats inférieurs à 16% ou supérieurs à 84%, alors que des résultats pouvant aller jusqu'à 145% ont été observés pour un rapport de 9 lipides/chlorophylle.

Lorsque l'on compare ces résultats avec ceux obtenus avec un rapport de 50 où aucune expérience n'a donné des résultats supérieurs à 1%, la tendance va donc certainement dans le sens des conclusions que nous tirons de nos graphiques. Il importe donc, non pas de s'attarder sur les écarts de fluctuations observés, mais bien de voir le comportement des extrêmes et plus particulièrement des maxima. De plus, tout au long de nos expériences, tant celles effectuées en faisant varier le rapport lipide/chlorophylle que celles effectuées en faisant varier les charges de surface, les expériences qui nous ont donné les variations de résistance, de conductance et de capacitance les plus importantes sont aussi les expériences pour lesquelles la qualité du rapport signal/bruit était la meilleure et aussi pour lesquelles les valeurs de résistance, de conductance et de capacitance sont les plus stables. Ceci vient confirmer l'importance qu'il faut apporter aux points que représentent les variations maximales de nos graphiques. En se rappelant ce qui a été précédemment énoncé sur la microcomposition du film, en particulier au voisinage de l'orifice, au moment critique de former la bicouche, on doit conclure que les fluctuations électriques observées sont dues justement à ces différences de microcomposition. En effet, pour un même rapport lipide/ chlorophylle, la microcomposition du mélange près de l'ouverture au moment critique de la formation de la bicouche peut faire en sorte que la bicouche incorporera des quantités différentes d'accepteurs et de donneurs, d'où la dispersité assez prononcée des résultats obtenus.

Un effet analogue est observé lorsque nous mesurons les variations de

capacitance spécifique en fonction du rapport lipide/chlorophylle. La figure 26 présente ces résultats. Ce graphique nous montre les variations de capacitance spécifique (C_{sp}) que nous avons mesurées concurremment aux mesures de résistance présentées à la figure 25. Nous utilisons la même convention qu'à la figure précédente en ce qui concerne les valeurs de C_{sp} . Ici encore, lorsque le rapport lipide/chlorophylle est de 50, il ne se produit aucune variation mesurable de la valeur de la capacitance durant et après l'illumination. Lorsque nous augmentons la quantité de Chl a, les variations apparaissent et deviennent alors mesurables.

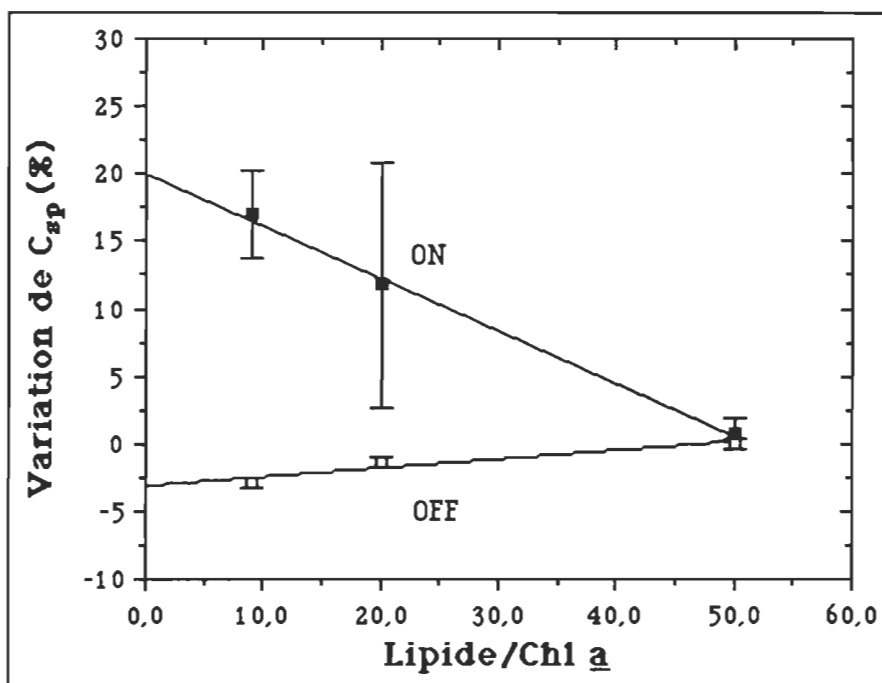


Figure 26. Variation de la capacitance spécifique en fonction du rapport lipide/chlorophylle

La figure 26 montre que lors de l'illumination, nous mesurons une augmentation de la capacitance membranaire, ce qui correspond soit à une augmentation

de la constante diélectrique du milieu lipidique, soit à une diminution d'épaisseur de la bicouche.

En effet, la valeur de capacitance d'une bicouche (C_{bic}) nous est donnée par:

$$C_{bic} = \frac{\epsilon_0 \cdot \epsilon_{bic} \cdot A_{bic}}{d_{bic}}$$

ou ϵ_0 représente la permittivité du vide, ϵ_{bic} la constante diélectrique du milieu lipidique, A_{bic} l'aire occupée par la bicouche et d_{bic} l'épaisseur de la bicouche (voir aussi White (1986)).

Etant donné que ϵ_0 et A_{bic} sont maintenus constants, les deux seules variables restantes sont la constante diélectrique du milieu et l'épaisseur de la bicouche. En effet, lors de l'expérimentation, on maintient l'aire de la bicouche à une valeur minimale, approximativement celle de l'orifice percé dans le film de téflon, en équilibrant au mieux les pressions hydrostatiques dans les deux bassins. Pour ce faire, les niveaux d'eau sont ajustés pour obtenir une lecture minimale de capacitance, correspondant ainsi à une valeur minimale de A_{bic} . Ce paramètre peut donc être considéré comme constant. Une variation maximale de +20% (figure 26) de capacitance peut donc impliquer une diminution d'épaisseur diélectrique de la bicouche de 20%, passant ainsi d'une valeur moyenne de 3,25 nm à une valeur minimale de 2,60 nm, une diminution de 0,65 nm! Il est en effet plausible d'imaginer que lors de l'illumination de la Chl a, l'aire par molécule moyenne augmente de telle sorte que l'eau au voisinage des têtes polaires pénètre un peu plus à l'intérieur de la bicouche, déplaçant ainsi la barrière hydro-

phile/hydrophobe et résultant en une diminution de l'épaisseur diélectrique (Brullemans et Tancrède (1987)). Les valeurs de capacitance sont extrêmement sensibles à la position de cette barrière (voir les références citées dans Brullemans et Tancrède (1987)); les membranes dont nous parlons maintenant contiennent des quantités appréciables de Chl a, il n'est pas illogique de croire qu'en régime stationnaire au cours de l'illumination de la Chl a, cette barrière puisse être effectivement déplacée. Toutefois, il n'est pas exclu non plus de croire que cette variation de capacitance résulte d'une variation de la constante diélectrique qui passerait d'une valeur de 2,5 (Duniec et Thorne (1980)) à une valeur maximale de 3,1, résultant de la modification de la constante diélectrique de la bicouche au moment du transfert d'électron consécutif à l'illumination en continu de la chlorophylle. Il est possible, enfin, que la variation de capacitance enregistrée résulte d'une combinaison des deux effets que nous venons de discuter, nos résultats ne nous permettant pas de distinguer entre ces deux possibilités.

Il est par ailleurs à noter que les variations de capacitance sont plus importantes lors de l'illumination (courbe **ON**) que lorsque la bicouche est dans le noir (courbe **OFF**), ce qui indique, compte tenu de la définition que nous avons donnée du terme **OFF**, que la valeur de capacitance ne revient jamais à sa valeur initiale lorsque l'on cesse d'illuminer la membrane, montrant par là qu'une perturbation permanente du milieu diélectrique est enregistrée. Nous reviendrons sur ce sujet important à la section 3.3.

3.2.3. Capacitance membranaire et Incorporation de la PQ-9

Cette section concerne l'étude des capacitances de bicouches avant leur illumination. Le tableau 1 présente les valeurs de capacitance (colonne 2) des différentes bicouches étudiées (colonne 1), de même que l'épaisseur diélectrique

calculée pour ces bicouches (colonne 3) en posant comme constante diélectrique de la région hydrocarbonée des bicouches, ϵ_{bic} , la valeur de 2,5 (Duniec et Thorne, (1980)). L'équation présentée à la section précédente a servi à effectuer ces calculs.

Tableau 1

Epaisseurs mesurées pour des bicouches lipidiques

Bicouches (Nombre)	Capacitance spécifique (nF·cm ⁻²)	Epaisseur diélectrique (nm)
PE / PE (23)	682±43	3,25±0,21
PE / PE:Chl a (50:1) (20)	681±44	3,25±0,21
PE:PQ-9 / PE:Chl a (50:1) (23)	678±20	3,27±0,10
PE:PQ-9 / PE:Chl a (20:1) (17)	673±30	3,29±0,15
PE:PQ-9 / PE (27)	658±30	3,36±0,15

Les résultats du tableau 1 montrent que l'épaisseur diélectrique des membranes des quatre premiers systèmes est à peu près la même, alors que pour les membranes n'incorporant que la PQ-9, cette épaisseur est plus grande. Pour établir si les variations que l'on peut voir dans le tableau 1 sont significatives nous avons utilisé le test de Student. Brièvement, si on connaît la moyenne, \bar{x} , la déviation standard, σ , et le nombre d'essais, n , de deux expériences (1 et 2) (donc, dans notre cas, de deux systèmes de reconstitution membranaire), nous pouvons vérifier si ces résultats diffèrent de façon significative par l'application de l'équation suivante:

$$t = \frac{x_1 - x_2}{\sqrt{\frac{(n_1-1)\sigma_1^2 + (n_2-1)\sigma_2^2}{n_1+n_2-2}} \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Dans cette équation, t représente la solution du test de Student. En considérant le nombre d'expériences, n , nous pouvons nous référer aux tables statistiques pour connaître la valeur correspondante de t en tant que probabilité d'existence. Il ressort de cette analyse que les différences présentes dans les valeurs des quatre premiers systèmes de reconstitution ne sont pas significatives. En effet, le test de Student nous indique qu'il existe une probabilité supérieure à 50% que ces résultats soient les mêmes. En d'autres termes, il existe une chance sur deux qu'il n'existe en fait aucune différence réelle entre ces résultats. Il en est autrement pour le cinquième, i.e. PE:PQ-9/PE. Le test de Student nous révèle que l'écart que nous voyons entre cette valeur et les quatre autres est réel et ce, avec une probabilité d'existence de plus de 98%. Il n'existe donc que moins de 2% de chance que cet écart ne soit pas significatif. Ainsi, nous pouvons donc être assurés de la validité de ces résultats et que l'analyse que nous en ferons ci-dessous est basée sur des données significatives.

Prenons en considération que les constantes diélectriques associées aux différents produits tensio-actifs utilisés soient sensiblement les mêmes, i.e. $\epsilon_{PE} \approx \epsilon_{PQ9} \approx \epsilon_{CH1}$. Nous pouvons voir au tableau 1 que la seule valeur qui excède 3,3 nm est celle qui est obtenue avec PE:PQ-9/PE. Une interprétation possible de ce résultat est de supposer que **la PQ-9 se trouve incorporée dans le plan mitoyen de la bicouche, accroissant ainsi l'épaisseur de cette dernière**. Nous verrons au prochain paragraphe pourquoi les autres systèmes incorporant la PQ-9 semblent ne pas obéir à cette règle. Si l'on calcule en effet

l'épaisseur moyenne d'une bicouche PE/PE, et que l'on y ajoute l'épaisseur de la molécule de PQ-9 (0,15x0,62x0,62 nm pour la tête quinone), nous obtenons alors approximativement comme épaisseur le résultat expérimental que nous avons obtenu avec PE:PQ-9/PE. Ce résultat abonde aussi dans le sens de l'hypothèse de Millner et Barber (1984) basée sur des études en monocouche et en calorimétrie différentielle à balayage. Ces auteurs soutiennent que les quinones à longues chaînes, et surtout la PQ-9, sont situées très profondément dans les bicouches, très près du plan central.

Toutefois, il appert que l'épaisseur des bicouches contenant la Chl a **et** la PQ-9 n'est pas plus grande que celle des bicouches de phospholipides purs, ou que des bicouches ne contenant que des lipides et de la Chl a **et pas** de PQ-9 (tableau 1, lignes 2 à 4). Etant donné que la Chl a est constituée d'une énorme tête porphyrrique et d'une seule chaîne aliphatique, tandis que les lipides ont une plus petite tête polaire et deux chaînes aliphatiques, il peut alors se créer un "manque" dans la bicouche, comme nous avons pu le constater à la figure 24, une sorte de défaut comme ceux que l'on rencontre parfois dans les cristaux (par pure analogie). Etant donné, par ailleurs, que la partie la plus "large" de la PQ-9 est en fait la tête quinone, on peut supposer que la tête quinone de la PQ-9 comblera le "manque" créé dans la bicouche par l'incorporation de la Chl a, selon le modèle de Brasseur et coll. (1984), et ce, sans ajouter à l'épaisseur de la bicouche.

A la lumière des résultats dont nous avons discuté plus haut concernant l'incorporation de la Chl a dans les bicouches et de ceux dont nous venons de discuter concernant l'incorporation de la PQ-9 dans ces dernières, le modèle présenté schématiquement à la figure 27 nous semble résumer nos observations de la façon la plus rationnelle. Il faut se rappeler ici qu'il s'agit d'une représentation statique en deux dimensions, d'une réalité dynamique tridimensionnelle.

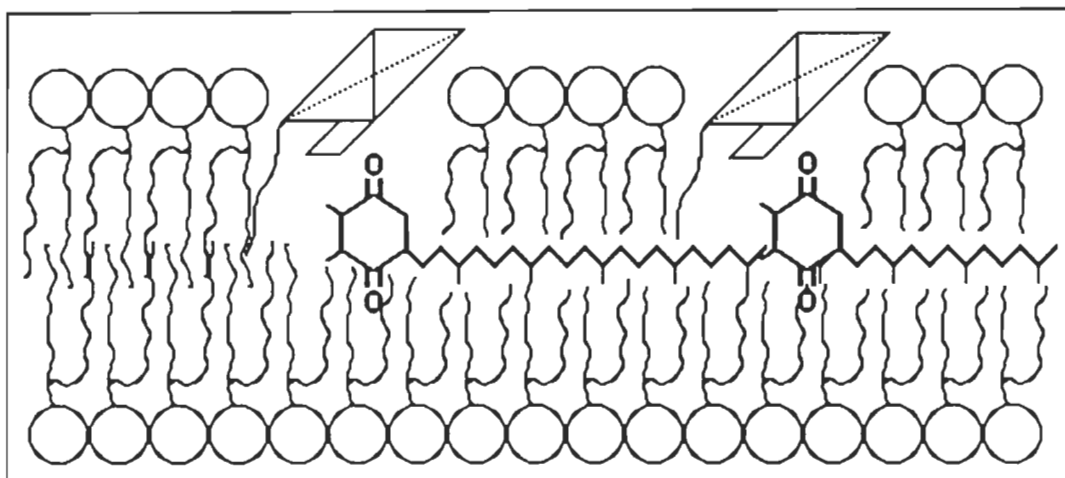


Figure 27. Modèle d'incorporation de la Chl a et de la PQ-9 dans les bicouches lipidiques.

On peut voir que la Chl a est incorporée dans la bicouche avec la chaîne phytyle servant d'ancre à l'intérieur de la bicouche, au niveau des chaînes aliphatiques des lipides. La tête porphyrrique, quant à elle, est incorporée au niveau des têtes polaires des lipides. La PQ-9 se situe dans le plan de la bicouche, au centre de cette dernière. La tête quinone de la PQ-9 se positionne de façon à combler le "manque" créé dans la bicouche par la position de la Chl a.

Section 3.3. Etude en fonction de la charge de surface

Nous abordons maintenant ce qui constitue l'élément central de notre étude et qui concerne l'influence des charges de surface sur l'efficacité de transfert d'électron entre la Chl a et la PQ-9 incorporées dans des bicouches lipidiques asymétriques. Cette section comporte deux volets: nous discuterons d'abord de l'utilisation de lipides chargés pour apporter une charge électrique nette au niveau de la bicouche. Cette charge sera négative pour la PS et positive pour le DMDSAm (voir section 2.2.1.1.). Nous discuterons ensuite de l'utilisation d'ions

Ca^{++} pour pouvoir éventuellement neutraliser la charge apportée par la PS et restaurer une certaine électroneutralité au niveau des interfaces.

3.3.1. Utilisation de lipides chargés

Nous avons utilisé des lipides chargés de façon à pouvoir moduler la charge de surface de nos bicouches lipidiques sans causer une trop grande perturbation du milieu. Le problème auquel nous avons eu à faire face concerne le nombre exact de lipides qui sont incorporés dans la bicouche à chaque expérience. Nous avons déjà souligné ce point lorsque nous avons discuté de la microcomposition du film qui servira à reconstituer la bicouche et du phénomène de ségrégation latérale qui peut s'y produire. Il n'est donc pas assuré que les lipides que nous déposons à l'interface tampon-argon se retrouveront dans les mêmes proportions au niveau de la bicouche. Nous ne serons donc pas certains de la charge de surface réelle que portera la bicouche. Pour connaître la charge de surface réelle, il faudrait effectuer des mesures du courant en fonction de la tension, ou plus simplement des courbes courant-voltage. Ceci dépassant le cadre du travail, nous devons donc demeurer dans l'incertitude en ce qui concerne la charge de surface précise de nos bicouches, tout en étant toutefois parfaitement conscients du problème.

Pour cette raison, les expériences de reconstitution seront répétées plusieurs fois, de façon à obtenir un comportement qui reflétera le plus fidèlement la réalité. Lorsque nous présenterons des résultats concernant les charges de surface (e.g. tableaux, graphiques), les valeurs qui y seront indiquées seront les valeurs que nous avons calculées en supposant que les lipides se retrouvent à l'intérieur de la bicouche dans les mêmes proportions que celles dans lesquelles nous les avons déposés à l'interface tampon-argon.

Lors de nos expériences, nous avons maintenu la quantité de plastoquinone-9 à 1 PQ-9 pour 10 lipides (10% mol). Aussi, nous avons conservé 1 Chl a pour 20 lipides (4,7% mol) (voir section 3.2.1.). Les matrices utilisées contenaient de la PE (charge électrique nulle), un mélange PE:PS (1:1, mol:mol) (charge négative), ou un mélange PE:DMDSAm (85:5, mol:mol) (charge positive). Il est à noter qu'il nous a été impossible d'effectuer des reconstitutions membranaires en utilisant un interface composé de PS:Chl a, et c'est pourquoi la PS fut diluée avec la PE.

Dans le but d'évaluer de façon quantitative les charges de surface et d'avoir ainsi un paramètre permettant d'effectuer des comparaisons entre les différents systèmes, nous avons procédé de la façon suivante. Un mélange contenant PE:PS:Chl a (10:10:1) contient environ 10 charges négatives par molécule de Chl a. Plus exactement, il y a 10,16 charges négatives par molécule si l'on tient compte des aires moléculaires des lipides et de la Chl a et de la surface de la bicouche. Connaissant la valeur d'une charge élémentaire, nous pouvons calculer que cette Chl a ressent une charge de $-1,63 \cdot 10^{-18}$ Coulomb (ou atto-Coulomb, aC), donc une charge de surface de $-1,63 \text{ aC} \cdot \text{moléc}^{-1}$. De plus, notre convention de signe sera la suivante: lorsque la **PS** est située **du même côté** que la Chl a, le champ électrique créé possède son pôle négatif de ce même côté de la bicouche. Nous dirons alors que la charge de surface par molécule de Chl a est **négative**. Lorsque la **PS** est située **de l'autre côté** de la bicouche, i.e. celui opposé à la Chl a, alors le champ électrique créé par la PS est orienté de telle sorte que le pôle positif du champ soit du côté de la Chl a, et ainsi nous dirons que la charge de surface par molécule de Chl a est **positive**. Lorsque nous utiliserons le DMDSAm, il sera positionné du côté opposé à la Chl a et ainsi, pour cette molécule, le champ électrique créé possèdera son pôle positif du côté où le DMDSAm aura été incorporé. Pour cette raison, la convention de signe utilisée

pour le **DMDSAm** sera la suivante: lorsque celui-ci sera incorporé **du côté opposé** à celui contenant la Chl a, alors nous dirons que la charge de surface par molécule de Chl a est **négative**. Le tableau 2 nous montre les systèmes de reconstitution membranaire que nous avons étudiés (1^{ière} colonne) et les charges de surface résultantes que nous obtenons (colonnes 2 et 3) .

Tableau 2
Reconstitution membranaire: systèmes utilisés

Système utilisé	Charge de Surface	
	(aC·moléc Chl <u>a</u> ⁻¹)	(charge·moléc Chl <u>a</u> ⁻¹)
PE:PQ (9:1) vs PE:Chl (20:1)	0,00	0,00
PE:PS:PQ (9:9:2) vs PE:Chl (20:1)	1,75	10,9
PE:PQ (9:1) vs PE:PS:Chl (10:10:1)	-1,63	-10,2
PE:DMDSAm:PQ (85:5:10) vs PE:PS:Chl (10:10:1)	-1,83	-11,4

Lors de nos expériences, nous avons ainsi fait varier la charge de surface entre +1,75 et -1,83 aC par molécule de Chl a (tableau 2, 2^{ième} colonne), ce qui équivaut à faire varier le nombre de charges élémentaires par molécule de Chl a entre +10,9 et -11,4 (tableau 2, 3^{ième} colonne). Si nous convertissons ces valeurs de charge de surface par molécule de Chl a en charge de surface par unité de surface, en utilisant l'aire moléculaire des lipides et de la Chl a, nous rendons les valeurs extrêmes de charge de surface de +1,75 et -1,83 aC·moléc⁻¹ équivalentes à des valeurs de +14,8 et -15,5 $\mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$. A titre de comparaison, la densité de charges de surface de la face interne des thylakoïdes est de -3,4 $\mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$ alors

que celle de la face externe est de $-2,1 \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Duniec et Thorne, (1980), Thorne et Duniec (1983).

3.3.1.1. Etude des propriétés spectroscopiques de la Chl a incorporée dans des matrices lipidiques chargées

Nous discuterons d'abord de l'influence des charges de surface sur les spectres de fluorescence de la Chl a. Les spectres de fluorescence se ressemblent tous et sont semblables à celui présenté à la figure 22. Nous avons relevé, pour chacun d'eux, la position du maximum de fluorescence et la figure 28 en montre quelques-uns en relation avec la charge de surface (les autres ayant été omis pour raisons de clarté). En appliquant le test de Student à ces valeurs, nous remarquons que les différences de position du λ_{max} en fonction de la charge de surface ne sont pas significatives. En d'autres termes, nous y observons que la position du λ_{max} n'est pas du tout influencée par la présence de différentes charges de surface.

Dans toute la gamme de charges de surface que nous avons étudiée, nous constatons que les λ_{max} sont toujours observés à 676 ± 5 nm, ce qui correspond à ce que Beddard et coll. (1976) ont observé (677 nm) dans les vésicules et les liposomes de phosphatidylcholine et/ou de galactolipides. De plus, nous avons aussi constaté que l'intensité des spectres de même que leur forme ne sont pas non plus affectées par les charges de surface. Ce résultat est en soi très surprenant : la polarité du milieu influence la position du λ_{max} , mais pas la charge de surface.

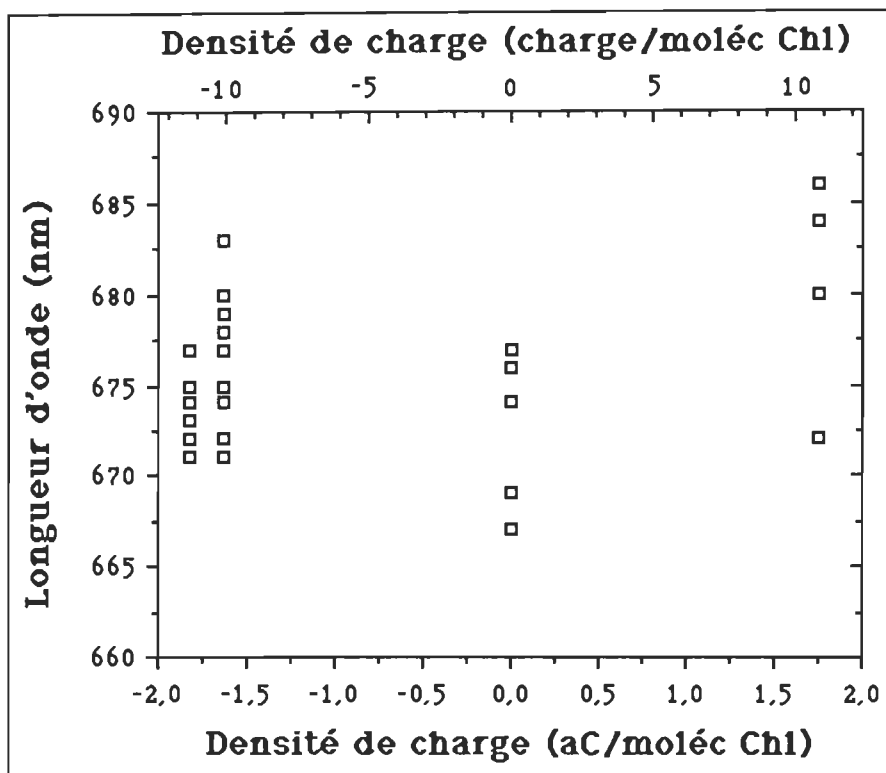


Figure 28. Position du maximum de fluorescence en fonction de la charge de surface

Pour expliquer ce comportement, on peut suggérer que la Chl a puisse se retrouver sous forme agrégée et qu'ainsi elle devienne peu sensible à l'effet de charge de surface. Il est en effet possible, comme nous l'avons souligné précédemment à la section 3.2.1., que la chlorophylle a se trouve en fait incluse dans des microdomaines contenant presque exclusivement de la Chl a et qu'ainsi, elle devienne insensible aux variations de charge de surface des lipides, desquels elle est séparée par sa position dans les microdomaines. De plus, la Chl a présente à l'intérieur de ces microdomaines existe sous forme de monomères. En effet, nos spectres de fluorescence nous indiquent par la position du λ_{\max} , $676 \pm 5 \text{ nm}$, que nous avons affaire à de la Chl a sous forme de monomère, i.e. sous forme non

agrégée (n-mères). En effet, la présence de dimères se ferait sentir par l'apparition d'un pic à 688 nm et les formes plus importantes d'agrégats, elles, produiraient un pic de fluorescence aux environs de 710 nm (Katz et coll. (1978), de Wilton et coll. (1982) et de Wilton et Koningstein (1983)). A la lumière de ces résultats, il semble que le facteur le plus important en ce qui concerne les propriétés de fluorescence de la Chl a soit le fait que la tête porphyrrique "baigne" dans un milieu dont la polarité est située quelque part entre 25 et 35, et que la Chl a se retrouve répartie en microdomaines contenant presque exclusivement de la Chl a et qu'ainsi, elle soit insensible, du point de vue spectroscopique, aux variations de charges de surface.

Nous avons aussi comparé nos mesures de fluorescence en fonction des changements de propriétés électriques observés lors de nos diverses expériences. Aucune corrélation n'a pu être établie entre la position du λ_{max} ou l'intensité maximale de fluorescence et les variations de résistance, conductance ou capacitance membranaire. Il semble donc que les modifications spectroscopiques et électriques soient distinctes les unes des autres, peut-être à cause de la grande quantité de Chl a incorporée dans nos bicouches, ou d'autres facteurs dont nous parlerons plus loin. Il pourrait y avoir suffisamment de Chl a pour qu'une partie puisse effectuer des réactions de transferts d'électrons avec la PQ-9 sans interférer sur les propriétés de fluorescence des molécules de Chl a libres qui, elles, n'effectueraient pas de telles réactions de transferts d'électrons.

Nous avons ensuite déterminé le rendement quantique d'émission de fluorescence de la Chl a incorporée dans les bicouches. Dans son ouvrage, Turro (1978) nous indique que l'on peut relier l'intensité de fluorescence de la Chl a (I_{Fluo}) et son rendement quantique de fluorescence (Φ_{Fluo}). En modifiant l'équation

afin de pouvoir l'utiliser en deux dimensions, i.e. dans une bicouche, nous obtenons:

$$I_{\text{fluo}} = \frac{2,303 \cdot I_{\text{Laser}} \cdot \epsilon_{632,8} \cdot \Phi_{\text{Fluo}} \cdot N_{\text{Chl}}}{S_{\text{bic}}}$$

ou I_{Laser} représente l'intensité incidente du laser; $\epsilon_{632,8}$, le coefficient d'extinction molaire de la Chl a à 632,8 nm; N_{Chl} , représente le nombre de molécules de Chl a incorporées dans la bicouche, et S_{Bic} , la surface de cette bicouche. Cette relation est valide seulement si le milieu n'absorbe que faiblement la lumière. La Chl a est incorporée dans une matrice lipidique entourée de part et d'autre d'une solution aqueuse. L'eau, de même que les autres constituants de la bicouche, i.e. les lipides, la PQ-9 et le DMDSAm, n'absorbent aucunement la lumière à la longueur d'onde d'excitation de la Chl a utilisée dans ces expériences. Rappelons qu'il s'agit de la raie d'émission à 632,8 nm d'un laser He-Ne. Ainsi, la Chl a étant la seule espèce moléculaire présente absorbant dans cette région spectrale, nous pouvons considérer que le milieu absorbe faiblement la lumière, et ce même si le coefficient d'absorption molaire de la Chl a, $\epsilon_{632,8}^{\text{Chl}}$, est égal à 11391 litre·mol⁻¹·cm⁻¹, la Chl a étant présente en faible quantité (i.e.5%). Le faisceau laser possède un diamètre de 1,0 mm et une intensité de 4,06 mW, l'intensité maximale des spectres de fluorescence varie entre 5,0 et 20,0·10⁶ photons·sec⁻¹. Les bicouches occupent une surface de 5,309·10⁻⁴ cm² et elles contiennent environ 4,50·10⁹ molécules de Chl a, ce qui représente environ 7,5·10⁻¹⁵ mole. Après calculs, nous obtenons comme résultat que le rendement quantique d'émission de fluorescence de la Chl a (Φ_{Fluo}) incorporée dans nos bicouches lipidiques est de l'ordre de 3,9 ± 2,3·10⁻⁵. Le rendement quantique de fluorescence est, comme nous pouvons le voir, très faible. Nous reviendrons plus tard sur l'importance de ce

faible rendement quantique.

3.3.1.2. Etude des propriétés électriques reliées au transfert d'électron chlorophylle-quinone dans des matrices lipidiques chargées

Nous débuterons cette section en présentant tout d'abord les modifications de conductance spécifique que nous avons observées expérimentalement, lors de l'excitation de la Chl a, en fonction de la charge électrique présente à la surface des bicouches. Nous présenterons par la suite les modifications de capacitance spécifique avant de passer aux conclusions.

Les résultats sont présentés graphiquement à la figure 29. En ordonnée, nous pouvons voir le changement de conductance spécifique, S_{sp} . Ce changement de conductance est présenté en fonction de la charge de surface, soit en $\mu C \cdot mol^{-1}$, soit en charge élémentaire par molécule de Chl a. Il est utile de se référer au tableau 2 pour se remémorer comment ces valeurs de charges de surface ont été calculées, de même que la convention de signes que nous avons adoptée et décrite à la section 3.2.1. Rappelons aussi la convention que nous avons définie à la figure 25 et qui concerne les valeurs et les descriptifs attribués aux courbes présentées à la figure 29. Lorsqu'une variation de conductance S_{sp} égale +100%, ceci indique que la valeur de conductance est passée d'une valeur **S** à une valeur **2S**. Dans le même ordre d'idée, une variation de -50% indique une valeur de conductance qui est passée d'une valeur **S** à une valeur **S/2**. Cette convention s'applique aussi au graphique de variation de capacitance présenté à la figure 30. Dans cette figure, la courbe marquée **ON** représente le changement de conductance de la membrane lorsque nous l'illuminons, par rapport à une valeur initiale prise immédiatement avant illumination; la courbe dénommée **OFF**

représente la variation de la conductance membranaire qui se produit après que nous ayons coupé l'illumination (environ 2 minutes après), par rapport à la valeur de conductance obtenue à la toute fin de l'illumination. On peut donc voir à la figure 29 (courbe **ON**) que la conductance de la bicouche varie en fonction de la charge de surface lorsque l'on excite la Chl a.

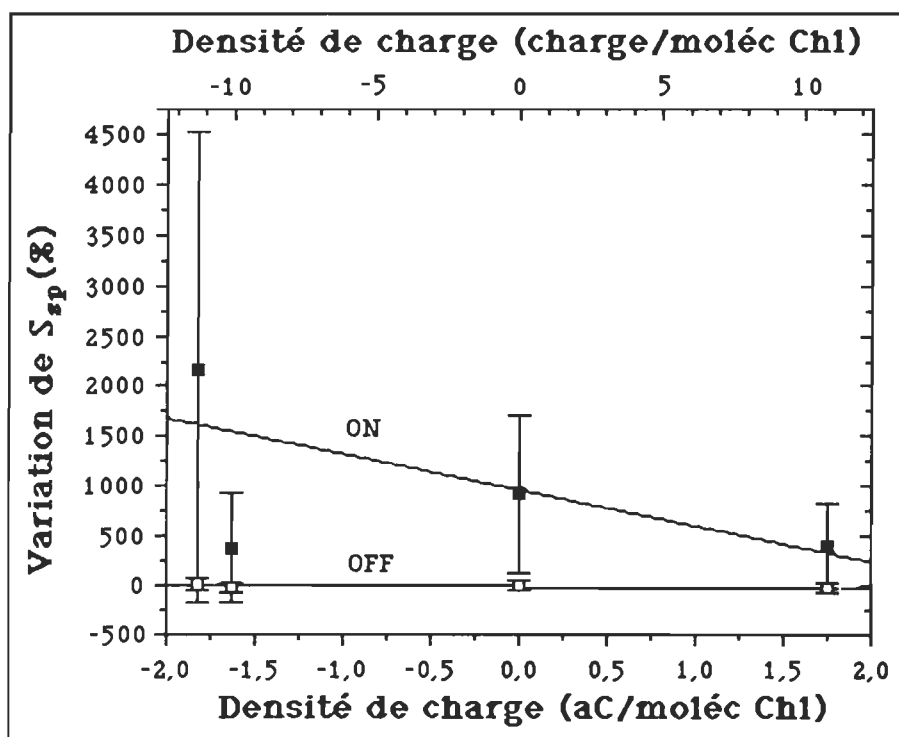


Figure 29. Variation de la conductance spécifique en fonction de la charge de surface

Rappelons brièvement l'argumentation développée à la section 3.2.2. concernant l'importance des barres d'erreur qui sont observées à la figure 29 et sub-séquentement à la figure 30. Nous avons expliqué pourquoi il ne faut pas s'attarder sur l'étendue des barres d'erreur comme telles, mais plutôt sur les valeurs maximales atteintes. Ainsi par exemple, pour une densité de charge corres-

pendant à environ $+1,75 \text{ aC}\cdot\text{moléc}^{-1}$, des modifications de conductance variant entre 0 et +850 % de leur valeur initiale sont observées. Ces modifications varient entre +130 et +1700 % lorsque la charge de surface est nulle, et elles oscillent entre 0 et +4500 % lorsque la charge de surface est d'environ $-1,83 \text{ aC}\cdot\text{moléc}^{-1}$. Seuls les points situés à $-1,63 \text{ aC}\cdot\text{moléc}^{-1}$ ne suivent pas la tendance générale; nous expliquerons pourquoi un peu plus loin.

Ainsi, le point essentiel mis en évidence par l'analyse de la figure 29 consiste en une variation de l'intensité du changement de conductance en fonction de la charge de surface. Etant donné que cette variation de conductance est associée à un transfert d'électrons au travers de la bicouche, (section 3.2.2.), cela implique que l'intensité du transfert d'électrons est directement influencée par les charges électriques présentes à la surface de la bicouche.

Nous allons maintenant analyser individuellement les variations observées à la figure 29 lors de l'excitation de la Chl a, i.e. la courbe **ON**. Tout d'abord, considérons la matrice lipidique symétrique neutre composée de PE des deux côtés et correspondant à une densité de charge de $0,00 \text{ aC}\cdot\text{moléc}^{-1}$. Nous observons des transferts d'électrons qui font augmenter la conductance de la bicouche d'un facteur moyen d'environ 1000%. En d'autres termes, il y a une augmentation de conductance d'un ordre de grandeur au cours du transfert d'excitation de la Chl a vers la PQ-9. Gardons en tête cette valeur qui nous servira de point de référence.

Considérons maintenant une bicouche asymétrique contenant de la PS du côté opposé à celui qui contient la Chl a. Selon notre convention de signe, le pôle positif du champ électrique créé par la PS est situé du côté de la Chl a. Ainsi, l'orientation du champ électrique n'est pas, en théorie, favorable au processus de transfert d'électron. En effet, lors du transfert de la Chl a vers la PQ-9, l'électron

devra voyager dans un champ électrique dont l'orientation est telle qu'elle défavorisera ce transfert, l'électron devant s'éloigner du pôle positif pour se rapprocher du pôle négatif. Nous devrions alors obtenir des changements de conductance inférieurs à ceux obtenus avec les bicouches neutres, contenant de la PE des deux côtés. Expérimentalement, nous observons en effet que les variations de conductance mesurées dans ce cas (i.e. correspondant à une charge de surface de $+1,75 \text{ aC}\cdot\text{moléc}^{-1}$, fig. 29) ne sont, en moyenne, que de 400%, i.e. moins de la moitié des variations observées précédemment.

Invertissons maintenant la matrice lipidique. Plus exactement, utilisons une matrice asymétrique contenant de la PS du même côté que la Chl a. Ainsi, théoriquement, nous créons une situation dans laquelle l'orientation du champ électrique est favorable aux transferts d'électrons, le donneur se trouvant du côté négatif du champ. Nous devrions donc nous attendre à des changements de conductance supérieurs à ceux obtenus avec les bicouches neutres, les bicouches PE/PE. Toutefois, la figure 29 montre qu'à une charge de surface de $-1,63 \text{ aC}\cdot\text{moléc}^{-1}$, correspondant aux bicouches que nous venons de décrire, les augmentations de conductance sont de l'ordre de 400% seulement, i.e. équivalents à ce que nous avons obtenu lorsque le champ était orienté dans le sens inverse! Nous nous serions attendu, en effectuant une extrapolation linéaire de nos résultats précédents, à obtenir un résultat avoisinant les +1450% si notre théorie concernant l'effet du champ était bonne. Il n'existe qu'une façon d'expliquer pourquoi les expériences effectuées à $-1,63 \text{ aC}\cdot\text{moléc}^{-1}$ n'ont pas donné les résultats escomptés. Nous ne pouvons que concevoir que lors de ces expériences, il a été impossible de recréer un microarrangement tel qu'il eut été possible d'optimiser la distribution des constituants de façon à obtenir des transferts d'électrons maximaux.

Pour forcer ce transfert d'électrons, il fut décidé d'utiliser une matrice

lipidique asymétrique incorporant la PS du côté de la Chl a et le DMDSAm du côté opposé, pour pouvoir ainsi créer un champ électrique plus puissant et donc plus favorable. Nous n'avons ajouté que 5%_{mol} de DMDSAm; au-delà de cette concentration les bicouches devenant instables. La charge de surface de cette matrice lipidique est de $-1,83 \text{ aC}\cdot\text{moléc}^{-1}$. Si effectivement notre hypothèse concernant l'influence du champ électrique était la bonne, il faudrait s'attendre à des variations de conductance moyenne accrues. Les résultats que nous avons obtenus vont effectivement en ce sens, l'augmentation de conductance moyenne étant d'environ 2200% (figure 29). Il semblerait donc que notre hypothèse concernant l'importance de l'orientation du champ électrique se vérifie.

Examinons maintenant le comportement de nos bicouches lorsque nous coupons l'illumination et que nous cessons de produire des transferts d'électrons. Ces résultats sont présentés à la figure 29, courbe **OFF**. La précision graphique étant insuffisante pour bien visualiser les valeurs, nous en effectuerons une étude à partir des données numériques. Ces données sont présentées au tableau 3 où sont exprimées pour les charges de surfaces étudiées, soit en $\text{aC}\cdot\text{moléc}^{-1}$ Chl a⁻¹, soit en charge $\cdot\text{moléc}^{-1}$ de Chl a, les variations de conductance observées environ 2 minutes après avoir coupé l'illumination, par rapport à la valeur de conductance obtenue à la toute fin de l'illumination. Ces variations de conductance, ΔS_{sp} , sont exprimées en % et l'erreur exprimée est en % elle aussi. Une valeur de $7\pm 9\%$ indique que la valeur varie entre -2% et 16%.

Tableau 3Variation de S_{sp} en fonction de la charge de surface

Charge de Surface		ΔS_{sp}
(aC·moléc Chl \underline{a} ⁻¹)	(charge·moléc Chl \underline{a} ⁻¹)	(%±%)
1,75	10,9	-13 ± 23
0,00	0,00	+8 ± 7
-1,63	-10,2	-26 ± 23
-1,83	-11,4	+7 ± 9

Il est remarquable de constater l'amplitude très faible du changement de conductance par rapport à ce que nous avons obtenu lors de l'illumination. Par exemple, pour une matrice lipidique asymétrique dans laquelle la PS est incorporée du côté opposé à la Chl \underline{a} (i.e. la matrice dont la charge de surface est de +1,75 aC·moléc Chl \underline{a} ⁻¹), nous avons obtenu lors de l'excitation de la Chl \underline{a} une variation de conductance de +400%. Après avoir coupé l'illumination, la conductance ne revient vers son niveau initial que très faiblement, correspondant à un changement de seulement -13%. Etant donné que l'orientation du champ influence directement l'efficacité du processus de transfert d'électron, on aurait pu supposer que cette orientation aurait aussi eu un effet sur le retour du niveau de conductance vers son niveau initial après avoir coupé l'excitation de la Chl \underline{a} . Si nous effectuons le test de Student sur les résultats du tableau 3, nous constatons que ces valeurs sont indiscernables entre elles et que les variations que l'on peut y voir sont de nature stochastique et ne démontrent aucune tendance réelle. En fait, cela veut dire que la conductance n'a aucune propension à revenir vers sa

valeur initiale plus de 2 minutes après l'arrêt de l'illumination. Nous pouvons voir à la figure 21 que l'augmentation de conductance n'est pas terminée après plus de 3 minutes d'illumination (figure 21, entre 3 et 6 minutes), ni qu'elle semble s'arrêter lors du retour dans le noir (figure 21, entre 6 et 11 minutes). Ce que cette figure ne montre pas, c'est que pour les quelques membranes à longue durée de vie que nous avons pu obtenir, i.e. celles qui ont résisté plus de 10 minutes après avoir coupé l'illumination, le retour de conductance dans le noir atteint un "plancher", i.e. un niveau de conductance minimal qui n'est pas celui de départ et qui lui est supérieur. Ainsi, dans tous les cas observés, le niveau de conductance dans le noir ne revient **jamais** à son niveau de départ et ce quel que soit le temps que l'on attende. Nous pouvons alors conclure qu'il s'est produit, lors du transfert d'électron, **une modification permanente de la conductance du milieu diélectrique de la bicouche**. De plus, cette modification n'est nullement influencée par la présence de charges de surface.

Pour tenter d'élucider la nature de cette modification, nous allons maintenant analyser les résultats que nous avons obtenus concernant la variation de la capacitance spécifique membranaire en fonction de la charge de surface. Ces résultats sont montrés graphiquement à la figure 30. En ordonnée, nous pouvons voir le changement de capacitance spécifique, C_{sp} . Ce changement de capacitance est présenté en fonction de la charge de surface, soit en $\text{aC} \cdot \text{moléc}^{-1}$, soit en charge élémentaire par molécule de Chl a. Il est à remarquer qu'il n'existe pas de données pour la courbe **OFF** à une charge de surface de $+1,75 \text{ aC} \cdot \text{moléc Chl a}^{-1}$, ceci à cause de la grande instabilité de ces bicouches, instabilité qui ne permettait pas une durée de vie suffisante pour pouvoir mesurer les variations de conductance après avoir coupé l'excitation. Nous pouvons voir qu'il existe une différence de comportement très nette entre les deux courbes, **ON** et **OFF**.

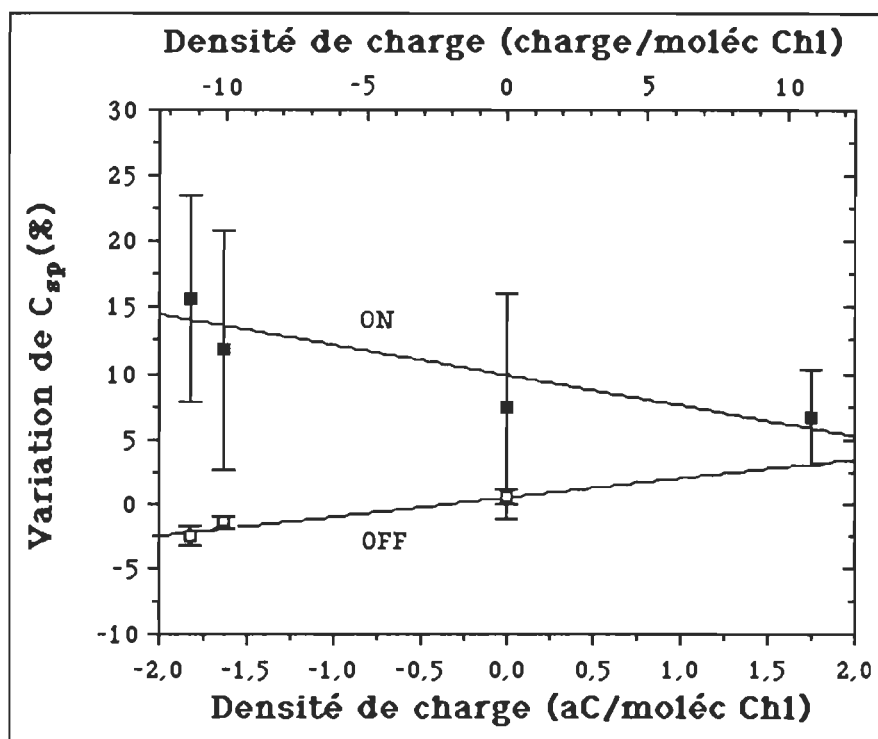


Figure 30. Variation de la capacitance spécifique en fonction de la charge de surface

Analysons tout d'abord le comportement de la courbe **ON**. Nous remarquons que les changements de capacitance varient de +6,6 à +15,6% environ lorsque la charge de surface passe de +1,7 à -1,8 aC·moléc⁻¹. Cela indique que lorsque le champ électrique est orienté de façon favorable, i.e. lorsque le pôle négatif du champ créé par la présence des lipides chargés est situé du côté de la Chl a, qui, faut-il le rappeler, est le donneur d'électron, la capacitance de la bicouche augmente. Nous avons vu à la section 3.2.2. la relation qui existe entre la capacitance de la bicouche, C_{bic} , la constante diélectrique du milieu bilipidique, ϵ_{bic} , l'aire occupée par la bicouche, A_{bic} , et l'épaisseur de la bicouche, d_{bic} . Une augmentation de la capacitance peut donc être interprétée soit par une augmen-

tation de l'aire de la bicouche, soit par une diminution de l'épaisseur de la bicouche, soit encore par une augmentation de la constante diélectrique de la membrane.

Examinons chacun de ces paramètres. Il est possible que, lors de l'illumination, la Chl a subisse un changement conformationnel qui soit tel que la molécule occupe une aire plus grande à la surface de la bicouche. Une telle augmentation forcerait les molécules environnantes à occuper une plus grande surface totale. Etant donné que la Chl a se retrouve d'un seul côté, la bicouche devra se courber, comme si on poussait sur elle du côté opposé à la Chl a, pour pouvoir maintenir une même pression de surface. Ceci est difficile car alors, la bicouche devra combattre la pression hydrostatique exercée par la hauteur de colonne d'eau de chaque côté du trou dans les bassins. C'est pourquoi nous avons écrit précédemment que la surface demeurerait constante. Par ailleurs, il se peut aussi que ce changement conformationnel soit tel qu'il permette aux molécules d'eau, au voisinage des têtes polaires, de pénétrer un peu plus bas dans la bicouche, déplaçant ainsi la barrière hydrophile/hydrophobe, résultant en une diminution de l'épaisseur diélectrique (section 3.2.2.). Toutefois, il n'est pas exclu non plus de croire que cette variation de capacitance résulte d'une variation de la constante diélectrique qui passerait d'une valeur de 2,5 (Duniec et Thorne (1980)) à une valeur maximale de 3,1, résultant de la modification de la constante diélectrique de la bicouche au moment du transfert d'électrons consécutif à l'illumination en continu de la chlorophylle. Il est possible, enfin, que la variation de capacitance enregistrée résulte d'une combinaison des deux effets que nous venons de discuter, nos résultats ne nous permettant pas de distinguer entre ces deux possibilités. Dans tous les cas, les valeurs de capacitance observées varient en fonction de l'orientation du champ électrique, elles sont minimisées dans le cas où le champ s'oppose au passage des électrons et maximisées dans le cas contraire.

Le comportement de la variation de capacitance, ΔC_{sp} , s'inverse lorsque nous coupons l'illumination. Les valeurs varient entre +0,4 et -2,4% lorsque la charge de surface passe de 0 à $-1,8 \text{ aC} \cdot \text{moléc}^{-1}$. Rappelons qu'il n'existe pas de données pour la courbe **OFF** à une charge de surface de $+1,75 \text{ aC} \cdot \text{moléc Chl } \underline{a}^{-1}$, dû à la grande instabilité de ces bicouches. Ainsi donc, lorsque le champ électrique est aligné favorablement aux transferts d'électrons, il favorise aussi un retour de C_{sp} vers sa valeur initiale. Ce changement est toutefois très faible comparativement au changement de conductance qui accompagne les transferts d'électrons et que l'on peut voir à la courbe **ON**. De fait, comme nous l'avons constaté à la figure 29 concernant les variations de conductance spécifique, la bicouche n'a aucune propension à revenir à ses propriétés électriques de capacitance ou de conductance lorsque l'excitation de la Chl a est stoppée. Ainsi, dans un cas comme dans l'autre, il s'est créé une perturbation permanente des propriétés du milieu diélectrique de la bicouche, perturbation imputable au processus de transferts d'électrons.

Essayons maintenant d'apporter un peu de lumière sur la nature de cette modification du milieu diélectrique de la bicouche, modification qui semble permanente, du moins dans la limite de la durée de vie des bicouches. Nous avons précédemment mentionné que la présence simultanée de la Chl a et de la PQ-9 est essentielle pour obtenir des modifications de propriétés électriques. Il faut donc exclure une modification du milieu diélectrique par une réaction quelconque des lipides, de la Chl a seule ou de la PQ-9 seule. Il semble que l'hypothèse la plus plausible soit une modification apportée à la fois par la Chl a et la PQ-9. Revenons au modèle d'incorporation de la Chl a et de la PQ-9 que nous avons proposé à la figure 27. D'après nos hypothèses, la Chl a est incorporée dans la bicouche selon le modèle de Brasseur et coll. (1984), avec la chaîne phytyle à l'intérieur de la bicouche et l'anneau porphyrrique orienté vers l'extérieur au niveau des têtes

polaires des lipides. La PQ-9 serait incorporée selon le modèle de Millner et Barber (1984), i.e. près du plan mitoyen de la bicouche. Le modèle de la figure 27 suggère une relative proximité entre l'anneau porphyrinique de la Chl a et la tête quinone de la PQ-9. A la lumière de nos résultats expérimentaux concernant une modification du milieu diélectrique et le modèle d'incorporation suggéré, nous proposons qu'une réaction de formation d'un complexe entre la Chl a et la PQ-9 pourrait être responsable de cette perturbation.

L'hypothèse de travail selon laquelle nous avons effectué nos expériences repose sur le transfert d'électron entre la Chl a et la PQ-9. Etant donné que la PQ-9 n'absorbe aucun photon dans toute la région spectrale comprise entre 540 et 800 nm, il est exclu que nous n'assistions qu'à un phénomène d'émission et de réabsorption de la lumière (émission par Chl a* et absorption par PQ-9). Il existe finalement peu de mécanismes possibles qui permettent d'effectuer des transferts d'électrons, à savoir : les transferts par échange d'électrons, ou mécanisme de collisions, les transferts par interactions coulombiques, ou mécanisme dit de Förster, et les transferts par effet tunnel. Nous discuterons, dans les prochains paragraphes, de chacun de ces mécanismes pour revenir ensuite sur celui qui explique le mieux nos résultats expérimentaux.

Le mécanisme des collisions implique que les molécules soient suffisamment près les unes des autres pour qu'un recouvrement des orbitales moléculaires ait lieu. Il importe que ce recouvrement soit le plus considérable possible pour permettre l'échange d'électrons. Un électron passe alors de l'orbitale de plus basse énergie du niveau excité du donneur à une orbitale du même type, mais vide, de l'accepteur. En retour, un électron passe de l'orbitale de plus haute énergie de l'état fondamental de l'accepteur vers une orbitale de même type du donneur, laissée vacante par l'excitation initiale de l'électron. Il s'agit en

fait d'une double substitution des électrons. L'efficacité de transfert est proportionnelle à l'intégrale de ce recouvrement spectral (J) et à une exponentielle de la distance séparant les molécules (D) et de leur rayons de van der Waals (R), selon $J \cdot e^{-D/R}$, ce qui implique que ce mécanisme n'est efficace qu'à courte portée, en fait il ne fonctionne efficacement qu'au contact.

De son côté, le mécanisme de type Förster agit de la façon suivante: une molécule excitée (et donc associée à un dipôle oscillant) peut causer l'oscillation des électrons, à l'état fondamental, d'une molécule voisine, de façon analogue à ce que produit le champ électrique d'une onde lumineuse. Pour créer un état excité de l'accepteur, une condition de résonance doit être créée et un couplage doit s'opérer. Lorsque la molécule excitée revient à l'état fondamental, le mouvement d'oscillation du dipôle propulsera un électron de l'accepteur de l'état fondamental vers un état excité. Il n'y a pas de transfert réel d'électrons, ceux-ci demeurant sur leur molécule respective. L'efficacité de transfert selon ce mécanisme est proportionnelle à l'intensité des dipôles de transition du donneur et de l'accepteur au carré (μ^2) et inversement proportionnelle à la sixième puissance de la distance (R^{-6}), selon $\mu_D^2 \cdot \mu_A^2 \cdot R_{DA}^{-6}$ c'est dire que nous avons affaire à un mécanisme opérant "à distance", sans contact réel entre les molécules, mais efficace à très courte portée.

Le mécanisme de transfert par effet tunnel ne s'applique qu'à de petites particules comme l'électron ou le proton et est basé sur des particularités de la mécanique quantique. En effet, en mécanique quantique, il est impossible de définir avec certitude la position et la vitesse de la particule, on ne peut que lui attribuer une certaine probabilité de se trouver à un endroit donné. Lorsque cette particule se retrouve devant une barrière d'énergie, comme une bicouche lipi-

dique, et que la particule ne possède pas l'énergie nécessaire pour passer cette barrière, selon la mécanique classique, l'équation de Schrödinger nous indique qu'il existe une probabilité non nulle que la particule se retrouve quand même de l'autre côté de cette barrière. Il est donc possible à une particule de "traverser" une barrière qu'elle ne devrait pas franchir selon la mécanique classique. Il est important à cet effet de constater que le passage de la particule s'effectue de façon isoénergétique.

Le modèle d'incorporation que nous avons présenté suppose une grande proximité entre les molécules de Chl a et de PQ-9. Dans ce cas, la PQ-9 se positionne au centre de la bicouche, et la séparation entre les molécules de Chl a et de PQ-9 est alors inférieure à 5 Å. Il faut se rappeler que la tête quinone de la PQ-9 possède une dimension de 1,5x6,2 x6,2 Å environ et que la tête porphyrrique de la Chl a mesure 1,5x15x15 Å. La bicouche possédant une épaisseur moyenne de 32,5 Å et la PQ-9 étant positionnée dans le plan mitoyen, il en résulte un rapprochement possible inférieur à 5 Å et possiblement même, contact entre les molécules de Chl a et de PQ-9. Il en résulte alors que les mécanismes de transfert par collision et ceux de type Förster deviennent hautement probables à cause de la très faible distance intermoléculaire.

Le mécanisme de transfert d'électrons de type Förster implique une condition de résonance qui doit être créée entre les orbitales du donneur et de l'accepteur. Cette condition de résonance implique des transferts d'électrons induits; c'est le retour de l'électron du donneur à l'état fondamental qui induit le mouvement d'un électron de l'accepteur vers un état excité. Etant donné qu'il n'existe aucun recouvrement spectral entre la Chl a et la PQ-9, nous devons éliminer ce type de mécanisme de transfert pour l'étude qui nous concerne.

De son côté, le mécanisme de transfert d'électrons par effet tunnel est un processus basé sur la probabilité, très faible, de retrouver une particule à un endroit où, selon la mécanique classique, il est impossible de la retrouver. Un transfert d'électron effectué à l'aide de ce mécanisme peut difficilement expliquer la perturbation permanente du milieu diélectrique de la bicouche qui a été observée expérimentalement.

Le mécanisme de transfert d'électrons par collisions implique, quant à lui, une interpénétration des orbitales des molécules réagissantes. Durant cette interpénétration, nous assistons à la création d'un complexe donneur-accepteur pouvant donner lieu à des réarrangements d'ordre chimique à l'intérieur même des molécules. De ces trois mécanismes, celui qui est susceptible d'induire des modifications profondes quant à la nature des molécules réagissantes est celui des collisions. Compte tenu des modifications permanentes du milieu diélectrique que nous avons observées, il est logique d'inférer qu'une telle modification du milieu diélectrique a pu être provoquée par la formation d'un complexe Chl a/PQ-9, qui se forme à l'état excité de la Chl a, qui ne se serait pas dissocié après la réaction de transfert d'électron, et qui posséderait une stabilité temporelle relativement grande .

Cette hypothèse est corroborée par le fait expérimental que l'illumination successive d'une même bicouche provoque des transferts d'électrons de moins en moins importants (comme nous avons pu le voir à la figure 21). Si l'on admet que le transfert d'électron amène la formation d'un complexe Chl a/PQ-9, alors lorsque nous illuminons pour la seconde fois une bicouche, celle-ci comporte **moins** de molécules **libres** de Chl a et de PQ-9. Ainsi, nous devrions observer des transferts d'électrons de moins en moins importants au cours des illuminations successives d'une seule et même bicouche.

Certaines expériences effectuées par Maruyama et coll. (1982) viennent étayer nos observations. En utilisant la technique ESR, ces auteurs ont démontré que le transfert d'électron entre la Chl a et une quinone (en fait, diverses sortes de quinones en solution dans CD_3OD) résulte en la formation d'une paire radicalaire: $\text{Chl}^{+\cdot}$ et $\text{Q}^{\cdot-}$. Etant donné que nous avons assisté à des transferts d'électrons, comme l'ont démontré nos mesures de conductance membranaire, il en résulte que notre complexe Chl a/PQ-9 **pourrait** devenir une paire radicalaire $\text{Chl}^{+\cdot}/\text{PQ}^{\cdot-}$.

De toutes ces expériences nous pouvons tirer les observations suivantes:

- [1] il est possible d'obtenir des transferts d'électrons entre la Chl a et la PQ-9 incorporées asymétriquement dans des bicouches lipidiques.**
- [2] Les transferts d'électron sont mesurables à la fois en utilisant des mesures de conductance et des mesures de capacitance.**
- [3] L'intensité de ces transferts d'électrons est dépendante de l'orientation du champ électrique créé par l'asymétrie lipidique.**
- [4] Lors de ces transferts d'électrons, il se crée une modification permanente du milieu diélectrique.**

Pour expliquer cette modification du milieu diélectrique observée, nous proposons donc l'hypothèse suivante: **le transfert d'électron entre la Chl a et la PQ-9 s'effectue par mécanisme de collisions. Ce mécanisme induit la formation d'un complexe $\text{Chl}^*/\text{PQ-9}$, pouvant mener à la formation d'une paire radicalaire $\text{Chl}^{+\cdot}/\text{PQ}^{\cdot-}$ stable dont les propriétés modifient les conditions diélectriques de la bicouche lipidique dans laquelle elle est incorporée.**

Revenons maintenant sur les calculs de rendement quantique que nous avons effectués à la section 3.3.1.1. Il existe plusieurs processus par lesquels une

molécule excitée peut libérer de l'énergie à son environnement et retourner à l'état fondamental. L'émission d'un photon de fluorescence en est un. Mais une molécule excitée peut aussi être désactivée thermiquement par les chocs avec les molécules environnantes. Elle peut aussi échanger un électron avec un accepteur situé dans les environs selon les différents mécanismes dont nous venons de discuter. Les faibles valeurs de rendement quantique obtenues nous indiquent qu'un ou plusieurs de ces mécanismes de désactivation compétitionnent efficacement avec le processus de désactivation par émission de fluorescence. Nous avons vu que l'intensité du maximum de fluorescence est indépendante de la charge de surface (section 3.3.1.1.). Nous avons vu aussi que la charge de surface influence les propriétés de transfert d'électron (section 3.3.1.2). Etant donné que, d'une part, le rendement quantique de fluorescence semble insensible aux variations de charge de surface, contrairement aux propriétés de transferts d'électrons, et que d'autre part, il n'est pas influencé non plus par les différentes valeurs de modifications de conductance et de capacitance, nous devons réaliser que ce n'est pas le mécanisme de transfert d'électrons qui compétitionne le plus efficacement avec le mécanisme de désactivation par fluorescence. En effet, si le mécanisme compétitif était celui de transfert d'électrons à un accepteur, nous aurions dû voir une modulation du rendement quantique de fluorescence en relation avec la modulation de transfert d'électrons. Comme il n'en est rien, nous pouvons supposer que le **processus non-radiatif de désactivation thermique est le plus important processus de désactivation présenté par la chlorophylle *a* excitée dans les bicouches reconstituées dans nos expériences.**

3.3.2. Neutralisation des charges de surface à l'aide d'ions calcium

Nous avons aussi effectué diverses expériences de reconstitution

membranaire en utilisant des ions Ca^{++} dans les sous-phases. Ces expériences avaient pour but de neutraliser la charge négative de la PS. La première constatation que nous fûmes à même de réaliser fut que la présence d'ions Ca^{++} déstabilise énormément les bicouches. En effet, pour deux systèmes de reconstitution membranaire identiques, l'un sur une sous-phase contenant 10 mM de Ca^{++} , l'autre n'en contenant pas, il est plus difficile de former des bicouches sur la sous-phase de Ca^{++} que sur l'autre. Le taux de réussite en ce qui concerne la formation est de deux à quatre fois moindres.

De plus, lorsque les bicouches sont formées, celles qui sont en contact avec des ions Ca^{++} dans la sous-phase ont un temps de vie inférieur à 5 minutes alors que ce temps de vie est supérieur à 15 minutes dans les cas où aucun ion Ca^{++} n'est présent. Il a été démontré que les ions Ca^{++} interagissent très fortement avec les monocouches et les bicouches contenant de la PS. Les films ont ainsi tendance à devenir plus rigides et plus instables (Albert *et coll.*, (1984) et les références citées dans cet article). Nous avons observé un effet identique lors de nos expériences de reconstitution membranaire.

En ce qui concerne les quelques mesures de conductance et de capacitance que nous avons réussi à effectuer, les résultats ne sont guère probants. Il a été impossible de construire des bicouches lorsque la PS et la Chl *a* se situent du même côté, en présence ou non d'ions Ca^{++} dans la sous-phase. Seules ont pu être reconstituées les bicouches contenant la PS du côté opposé à la Chl *a*. Toutefois, les bicouches ainsi obtenues sont extrêmement fragiles du point de vue mécanique: la moindre vibration suffit à les détruire. Aussi, leur temps de vie est très court, à peine 5 minutes. Nous avons pu mesurer des changements de conductance et de capacitance associés aux transferts d'électrons, mais il a été impossible de mesurer ces mêmes changements après avoir coupé l'excitation,

les bicouches ne résistant pas assez longtemps.

Ainsi, les seules expériences qui ont pu être effectuées le furent avec la matrice lipidique contenant d'un côté un mélange PE:PS:PQ-9 (9:9:2, mol:mol:mol) et de l'autre, un mélange PE:Chl a (20:1, mol:mol). Au cours de cette expérience, le champ électrique qui est normalement orienté de façon défavorable au transfert d'électron, devrait être annulé par la présence des ions Ca^{++} et la bicouche devrait se comporter comme s'il n'y avait pas de PS du tout. Dans ces conditions, l'ajout d'ions Ca^{++} devrait permettre d'augmenter le niveau de conductance, S_{sp} , de même que l'intensité du changement de capacitance, ΔC_{sp} .

Expérimentalement, à la limite de notre précision, la présence d'ions Ca^{++} n'induit aucune modification de comportement de ΔS_{sp} ou ΔC_{sp} lors de l'illumination par rapport aux mesures prises sans ions Ca^{++} . En fait, les résultats de variations de conductance et de capacitance sont identiques qu'il y ait ou non présence d'ions Ca^{++} dans les sous-phases.

Rappelons la discussion des sections 3.2.1. et 3.3.1.1. concernant l'organisation de la Chl a à l'intérieur de microdomaines. Nous avons vu que le comportement spectroscopique de la Chl a est insensible aux variations de charge de surface des lipides, desquels elle est séparée par sa position dans les microdomaines. De façon analogue, la présence de Chl a à l'intérieur de microdomaines presque exclusivement composés de Chl a rend celle-ci insensible aux différences de comportement lipidique associées à la présence d'ions Ca^{++} . Ainsi, les ions Ca^{++} n'ont pas d'influence, à la limite de précision de nos appareils, sur le transfert d'électron entre la Chl a et la PQ-9.

Nous apportons les hypothèses suivantes concernant l'influence des ions Ca^{++} : **la présence d'ions Ca^{++} déstabilise les bicouches lipidiques contenant de la PS.** Nous sommes assurés de cet effet, il n'y a aucun doute. De plus, **les ions Ca^{++} ne modifient en rien le transfert d'électron entre la Chl a et la PQ-9, de par la situation de la Chl a à l'intérieur de microdomaines.**

Chapitre 4. Conclusion

Dans ce court chapitre, nous résumerons les résultats obtenus au cours de notre travail et en effectuerons une synthèse.

Tout d'abord, il a été possible d'effectuer des expériences de reconstitution membranaire en incorporant asymétriquement à l'intérieur d'une matrice lipidique un donneur d'électron, la chlorophylle a (Chl a), et un accepteur d'électron la plastoquinone-9 (PQ-9). Les propriétés de charge de surface de ces bicouches ont été modulées à l'aide de mélanges de lipides neutres, positivement et négativement chargés.

D'une part, nos mesures spectroscopiques nous ont montré que la Chl a est incorporée dans les bicouches lipidiques sous forme de monomères, et que celle-ci se retrouve associée à l'intérieur de microdomaines, dont la constante diélectrique est située aux environs de 25 à 35, et qui comprennent majoritairement de la Chl a. Nous sommes parvenus à la conclusion que la conformation moléculaire adoptée par la Chl a est conforme au modèle proposé par Brasseur et coll. (1984), i.e. que la Chl a se positionne avec la chaîne phytyle dans la bicouche et l'anneau porphyrrique au niveau des têtes polaires des lipides.

Relativement à la conformation de la PQ-9, nos mesures de capacitance membranaire nous ont amené à conclure que la PQ-9 est incorporée à l'intérieur des bicouches selon le modèle proposé par Millner et Barber (1984) selon lequel la PQ-9 est incorporée dans le plan mitoyen de la bicouche accroissant ainsi l'épaisseur de cette dernière.

A la lumière des résultats concernant l'incorporation de la Chl a dans les bicouches et de ceux concernant l'incorporation de la PQ-9 dans ces dernières, nous avons présenté à la figure 27 un modèle moléculaire qui nous semble résumer nos observations de la façon la plus rationnelle. On peut voir que la Chl a est incorporée dans la bicouche avec la chaîne phytyle servant d'ancre à l'intérieur de la bicouche, au niveau des chaînes aliphatiques des lipides. La tête porphyrrique, quant à elle, est incorporée au niveau des têtes polaires des lipides. La PQ-9 se situe dans le plan de la bicouche, au centre de cette dernière. La tête quinone de la PQ-9 se positionne de façon à combler le "manque" créé dans la bicouche par la position de la Chl a.

Par ailleurs, nos mesures de conductance et de capacitance membranaire nous ont montré qu'il est possible d'obtenir des réactions de transferts d'électrons entre la Chl a et la PQ-9 incorporées asymétriquement dans les bicouches. De plus, nous avons constaté que l'intensité de ces transferts d'électrons est dépendante de l'orientation du champ électrique créé par l'asymétrie lipidique. A la suite de ces réactions de transferts d'électrons, il se produit une perturbation permanente du milieu diélectrique de la bicouche, modification qui n'est pas influencée par la présence de charges de surface.

Pour expliquer cette modification observée dans le milieu diélectrique, nous avons donc proposé l'hypothèse suivante: le transfert d'électron entre la Chl a et la PQ-9 s'effectue par mécanisme de collisions, les positions de la Chl a et de la PQ-9 à l'intérieur de la bicouche se prêtant bien à un tel mécanisme. De plus, ce mécanisme induit la formation d'un complexe $\text{Chl}^*/\text{PQ-9}$, pouvant mener à la formation d'une paire radicalaire $\text{Chl}^{+\bullet}/\text{PQ}^{-\bullet}$ stable dont les propriétés modifient ainsi les conditions diélectriques de la bicouche lipidique dans laquelle cette paire radicalaire est incorporée.

Aussi, nos mesures de fluorescence de la Chl a incorporée dans les bicouches nous ont montré que le rendement quantique de fluorescence est très faible, $3,9 \pm 2,3 \times 10^{-5}$, et qu'il n'est pas relié aux propriétés de transferts d'électrons. Nous en avons conclu que le processus non-radiatif de désactivation thermique est le plus important processus de désactivation présenté par la chlorophylle a excitée dans les bicouches reconstituées dans nos expériences.

A la suite de ces travaux, nous avons tenté d'étudier l'influence des ions Ca^{++} sur les efficacités de transferts d'électrons. Nous avons remarqué que la présence d'ions Ca^{++} déstabilise les bicouches lipidiques contenant de la PS. De plus, les ions Ca^{++} ne modifient en rien le transfert d'électron entre la Chl a et la PQ-9, de par la situation de la Chl a à l'intérieur de microdomaines.

Les résultats que nous avons obtenus par ce travail sont intéressants, en particulier si nous tentons de les replacer dans le contexte du transfert d'excitation *in vivo*. Nous pouvons en effet les utiliser pour apporter un élément de réponse servant à expliquer pourquoi le processus photosynthétique est si efficace dans la nature. Nous avons vu à la section 1.1.3. que Hol (1985) a récemment proposé que le moment dipolaire des hélices- α , qui composent la partie centrale des protéines transmembranaires, influe de façon importante les processus de transferts d'électrons. Les travaux en diffraction de rayons-x effectués par Deisenhofer et coll. (1985a, 1985b), Michel et coll., (1986), et Allen et coll., (1986) ont montré qu'à l'intérieur des centres réactionnels de *Rhodopseudomonas viridis*, les deux chaînes polypeptidiques les plus près du donneur d'électron (une paire de bactériochlorophylle a), sont positionnées de telle sorte que l'orientation du moment dipolaire des hélices- α favorise le transfert d'électron entre le donneur et l'accepteur d'électron (une ubiquinone). Les résultats que nous avons obtenu con-

cernant l'importance des charges de surface appuient donc l'hypothèse de Hol.

Ainsi, ce serait la position relative du donneur et de l'accepteur d'électron à l'intérieur des centres réactionnels qui, par l'orientation des hélices- α et donc du dipôle associé à la chaîne polypeptidique, serait probablement responsable de la grande efficacité de conversion énergétique et de séparation de charges que l'on retrouve dans le processus photosynthétique.

C'est une forme sans doute primitive de cet arrangement que nous avons recréée *in vitro* en plaçant de la chlorophylle a et la plastoquinone-9 dans un gradient de potentiel électrique favorable au transfert d'électron, le gradient de potentiel électrique étant généré par une asymétrie des charges au niveau des lipides plutôt que par l'environnement dipolaire associé aux hélices- α . Fondamentalement toutefois, il ressort clairement de notre étude que le gradient de potentiel électrique joue un rôle important dans la détermination de l'efficacité du transfert d'électron, à la fois *in vivo* et *in vitro*.

BIBLIOGRAPHIE

- Allen, J.P., Feher, G., Yeates, T.O., Rees, D.C., Deisenhofer, J., Michel, H., Huber, R., "Structural homology of reaction centers from *Rhodopseudomonas sphæroides* and *Rhodopseudomonas viridis* as determined by x-ray diffraction.", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83, 8589-8593.
- Albert, A.D., Sen, A., Yeagle, P.L., "The effect of calcium on the bilayer stability of lipids from bovine rod outer segment disk membranes.", Biochim. Biophys. Acta, 1984, 771, 28-34.
- Alonso, A., Gomez-Fernandez, J.C., Aranda, F.J., Belda, F.J.F., Goñi, F.M., "On the interaction of ubiquinones with phospholipids.", FEBS Letters, 1981, 132, 19-22.
- Alvarez, O., Latorre, R., "Voltage-dependent capacitance in lipid bilayers made from monolayers.", Biophys. J., 1978, 21, 1-7.
- Anderson, J.M., "Possible location of chlorophyll within chloroplast membranes.", Nature, 1975a, 253, 536-537.
- Anderson, J.M., "The molecular organization of chloroplast thylakoids.", Biochim. Biophys. Acta, 1975b, 416, 191-235.
- Beddard, G.S., Carlin, S.E., Porter, G., "Concentration quenching of chlorophyll fluorescence in bilayer lipid vesicles and liposomes.", Chem Phys. Letters, 1976, 43, 1, 27-32.
- Bolton, J.R., Hall, D.O., "Photochemical conversion and storage of solar energy." , Ann. Rev. Energy, 1979, 4, 353-401.
- Brasseur, R., de Meutter, J., Ruyschaert, J.M., "Mode of insertion of chlorophyll *a* in a lipid layer. A conformational approach.", Biochim. Biophys. Acta, 1984, 764, 295-300.
- Brullemans, M., Tancrede, P., "Influence of torus on the capacitance of asymmetrical phospholipid bilayers", Biophys. Chem., 1987, sous-presse.
- Cadenhead, D.A., Kellner, B.M., "Some observations on monolayer spreading solvents with special reference to phospholipid monolayers.", J. Colloid Interface Sci., 1974, 49, 143-145.

- Chapados, C., Parent, L., Hotchandani, S., Leblanc, R.M., "Aggregation of chlorophyll a in mono- and multilayers.", Résultats non publiés, 1984.
- Clayton, R.K., dans Photosynthesis: physical mechanisms and chemical patterns, 1980, Cambridge University Press, 19-130.
- Deisenhofer, J., Michel, H., Huber, R., "The structural basis of photosynthetic light reactions in bacteria.", Trends Biochem. Sci., 1985 a, 10, 243-248.
- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, R., Huber, R., Michel, H., "Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis*, at 3Å resolution.", Nature, 1985 b, 318, 618-624.
- De Wilton, A.C., Haley, L.V., Koningstein, J.A., "Detection limitations of photomultiplier tubes in pulsed-laser emission spectroscopy: time-resolved fluorescence of chlorophyll solutions", Can. J. Chem., 1982, 60, 2198- 2206.
- De Wilton, A.C., Koningstein, J.A., "Pulsed laser induced fluorescence spectra from the chlorophyll a dimer.", Spectros. Int. J., 1983, 2, 144-150.
- Duniec, J.T., Thorne, S.W., "A theory of charge separation, ion, electron and proton transport in photosynthetic membranes based on asymmetry of surface charges.", J. Theor. Biol., 1980, 85, 691-711.
- Fang, Y., Tollin, G., "Light-induced electron transfer reactions between chlorophyll and quinone in liposomes: radical formation and decay in negatively and positively charged vesicles.", Photochem. Photobiol., 1983, 38, 4, 429-439.
- Fang, Y., Tollin, G., " Light-induced electron transfer reactions between chlorophyll and quinone in electrically-charged vesicles: effects of counterions located in either the inner or outer aqueous phases on radical formation and decay.", Photochem. Photobiol., 1984, 39, 5, 685-695.
- Ford, W.E., Tollin, G., "Chlorophyll photosensitized electron transfer in phospholipid vesicle bilayers: Inside vs Outside asymmetry.", Photochem. Photobiol., 1982, 36, 647-655.
- Ford, W.E., Tollin, G., "Chlorophyll photosensitized vectorial electron transport across phospholipid vesicle bilayers: kinetics and mechanism.", Photochem. Photobiol., 1983, 38, 4, 441-449.
- Ford, W.E., Tollin, G., "Chlorophyll photosensitized electron transfer in

- phospholipid bilayer vesicles systems: correlations between kinetic parameters and solubilities of viologen acceptors.", Photochem. Photobiol., 1986, 43, 3, 319-330.
- Fringeli, U.P., Günthard, H.H., dans Membrane Spectroscopy, 1981, Grell ed, Springer-Verlag, 270-332.
- Gerisher, H., "Heterogeneous electrochemical systems for solar energy conversion.", Pure & Appl. Chem., 1980, 52, 2649-2667.
- Gounaris, K., Sundby, C., Andersson, B., Barber, J., "Lateral heterogeneity of polar lipids in the thylakoid membranes of spinach chloroplasts.", FEBS Letters, 1983, 156, 1, 170-174.
- Hall, J.E., Latorre, R., "Nonactin-K⁺ complex as a probe for membrane asymmetry.", Biophys. J., 1976, 15, 99-103.
- Hall, J.E., "Voltage dependent-lipid flip-flop induced by alametycin.", Biophys. J., 1981, 33, 373-381.
- Hansen, B.D., "Ion transport in asymmetric phospholipid bilayers.", Thèse de Doctorat en Biophysique, University of California in San Francisco, 1978.
- Hevesi, J., Singhal, G.S., "Relation between the absorption and the emission spectra of chlorophyll a and its derivatives at room and low temperature.", Spectrochimica Acta, 1969, 25A, 1751-1758.
- Hinninen, P.H., Ellfolk, N., "Separation and isolation of chlorophyll by multiple liquid-liquid partitions." Acta Chem. Scand., 1973, 27, 1463-1477.
- Hol, W.G.J., "The role of the α -helix dipole in protein function and structure.", Prog. Biophys. molec. Biol., 1985, 45, 149-195.
- Katsikas, H., Quinn, P.J., "The interaction of coenzyme Q with dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers.", FEBS Letters, 1981, 133, 230-234.
- Katz, J.J., Shipman, L.L., Cotton, T.M., Janson, T.R., "Chlorophyll aggregation: coordination interactions in chlorophyll monomers, dimers, and oligomers.", dans The Porphyrins, 1978, D. Dolphin, vol 5C, Academic Press, 401-458.
- Kingsley, P.B., Feigenson, G.W., "Proton NMR study of the location and motion of ubiquinones in perdeuterated phosphatidylcholine bilayers.", Biochim.

- Biophys. Acta, 1981, 635, 602-618.
- Kuhn, H., Möbius, D., Bücher, H., dans Physical Methods of Chemistry, 1972, Weissberger-Rossiter, vol 1, J. Wiley & Sons, 577-701.
- Kutnik, J., Ti Tien, H., "Properties of pigmented bilayer membranes as an energy transducer.", Photobiochem. Photobiophys., 1983, 6, 351-356.
- Lessard, J.G., Fragata, M., "Micro polarities of lipid bilayers in micelles. 3. Effect of monovalent ions on dielectric constant of the water membrane interface of unilamellar phosphatidylcholine vesicles.", J. Phys. Chem., 1986, 90, 811-817.
- Lopez, J.R., Ti Tien, H., "Reconstitution of Photosystem I reaction center into bilayer lipid membranes.", Photobiochem. Photobiophys., 1984, 7, 25-39.
- Maggio, B., Diplock, A.T., Lucy, J.A., "Interactions of tocopherols and ubiquinones with monolayers of phospholipids.", Biochem. J., 1977, 161, 111-121.
- Maruyama, K., Furata, H., Iwamura, H., Otsuki, T., "Complex formation between chlorophyll and quinone is suggested to be important in light-induced electron transfer.", Photobiochem. Photobiophys., 1982, 4, 47-51.
- Michel, H., Epp, O., Deisenhofer, J., "Pigment-protein interactions in the photosynthetic reaction centre from *Rhodospseudomonas viridis*.", The EMBO J., 1986, 5, 10, 2445-2451.
- Miljanich, G.P., Nemes, P.P., White, D.L., Dratz, E.A., "The asymmetric transmembrane distribution of phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, and fatty acids of the bovine retinal rod outer segment disk membrane.", J. Memb. Biol., 1981, 60, 249-255.
- Millner, P.A., Barber, J., "Plastoquinone as a mobile redox carrier in the photosynthetic membrane.", FEBS Letters, 1984, 169, 1, 1-6.
- Montal, M., Müller, P., "Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties.", Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 12, 3561-3566.
- Murphy, D.J., "The importance of non-planar bilayer regions in photosynthetic membranes and their stabilisation by galactolipids.", FEBS Letters, 1982, 150, 1, 19-26.

- Murphy, D.J., "The molecular organisation of the photosynthetic membranes of higher plants.", Biochim. Biophys. Acta, 1986, 864, 33-94.
- Murphy, D.J., Woodrow, I.E., " Lateral heterogeneity in the distribution of thylakoid membrane lipid and protein components and its implications for the molecular organisation of photosynthetic membranes.", Biochim. Biophys. Acta, 1983, 725, 104-112.
- Olson, J.M., "Chlorophyll organization in green photosynthetic bacteria.", Biochim. Biophys. Acta, 1980, 594, 33-51.
- Omata, T., Murata, N., "A rapid and efficient method to prepare chlorophyll a and b from leaves.", Photochem. Photobiol., 1980, 31, 183-185.
- Op den Kamp, J.A.F., "Lipid asymmetry in membranes.", Ann. Rev. Biochem., 1979, 48, 47-71.
- Op den Kamp, J.A.F., dans New Comprehensive Biochemistry, 1981, Neuberger-Van Deenen ed, vol I, Elsevier-North-Holland Biomedical Press, 83-126.
- Popovic, Z.D., Kovacs, G.J., Vincett, P.S., Alegria, G., Dutton, P.L., "Electric field dependence of recombination kinetics in reaction centers of photosynthetic bacteria.", Chem. Phys., 1986a, 110, 227-237.
- Popovic, Z.D., Kovacs, G.J., Vincett, P.S., Alegria, G., Dutton, P.L., "Electric-field dependence of the quantum yield in reaction centers of photosynthetic bacteria.", Biochim. Biophys. Acta, 1986b, 851, 38-48.
- Quinn, P.J., Esfahani, M.D., "Ubiquinones have surface-active properties suited to transport electrons and protons across membranes.", Biochem. J., 1980, 185, 715-722.
- Quinn, P.J., Williams, W.P., "The structural role of lipids in photosynthetic membranes.", Biochim. Biophys. Acta, 1983, 737, 223-266.
- Radunz, A., "Binding of antibodies onto the thylakoid membrane. VI. Asymmetric distribution of lipids and proteins in the thylakoid membrane.", Z. Naturforsch., 1980, 35c, 1024-1031.
- Rich, P.R., "Electron and proton transfers through quinones and cytochrome bc complexes.", Biochim. Biophys. Acta, 1984, 768, 53-79.

- Richard, J.P., "La purification et la caractérisation de la chlorophylle a.", Résultats non publiés, rapport interne du Centre de Recherche en Photobiophysique, Université du Québec à Trois-Rivières, 1985.
- Robert, S., Tancrede, P., Houle, A., Leblanc, R.M., "Electrical and emission properties of chlorophyll a in planar asymmetrical membranes.", Photochem. Photobiol., 1985, 41, 1, 101-106.
- Robertson, R.N., dans The Lively Membrane, 1983, Cambridge University Press, 80-99.
- Rothen, A., dans Physical Techniques in Biological Research, 1968, Moore, vol 2A, Academic Press, 217-275.
- Runquist, J., Loach, P.A., "Catalysis of electron transfer across phospholipid bilayers by iron-porphyrin complexes.", Biochim. Biophys. Acta., 1981, 637, 231-244.
- Sackmann, E., "Physical foundations of the molecular organization and dynamics of membranes.", dans Biophysics, 1983, Hoppe-Lohmann- Markl-Ziegler, 2nd Edition, Springer- Verlag, 425-430.
- Sahlberg, I., Hynninen, P.H., "Thin-layer chromatography of chlorophylls and their derivative on sucrose layers.", J. Chrom., 1984, 291, 331-338.
- Sato, N., Murata, N., "Preparation of chlorophyll a, chlorophyll b, and bacteriochlorophyll a by means of column chromatography with diethylaminoethyl-cellulose.", Biochim. Biophys. Acta, 1978, 501, 103-111.
- Sauer, K., "Photosynthesis-the light reactions.", Ann. Rev. Phys. Chem., 1979, 30, 155-178.
- Senthilathipan, V., Tollin, G., "Light-induced electron transfer reactions between chlorophyll and electrically charged acceptors in positively and negatively charged lipid bilayers vesicles.", Photochem. Photobiol., 1985, 42, 4, 437-445.
- Schönfeld, M., Montal, M., Feher, "Functional reconstitution of photosynthetic reaction centers in planar bilayers.", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 12, 6351-6355.
- Singhal, G.S., Williams, W.P., Rabinovitch, E., "Fluorescence and absorption

- studies on chlorophyll a *in vitro* at 77°K", J. Phys. Chem., 1968, 72, 3941-3951.
- Spisni, A., Masotti, L., Lenaz, L., Bertoli, E., Pedulli, G.F., Zanoni, C., "Interactions between ubiquinones and phospholipid bilayers.", Arch. Biochem. Biophys., 1978, 190, 454-458.
- Stahl, E., dans Thin-Layer Chromatography, 2^e ed., 1969, Springer-Verlag.
- Stillwell, W., Tien, H.T., "Protection of chlorophyll by phospholipids from photooxydation.", Biochim. Biophys. Res. Comm., 1977, 76, 2, 232-238.
- Tancrède, P., Parent, L., Paquin, P., Leblanc, R.M., "Interactions in mixed monolayers between dioleoyl-L- α -phosphatidylcholine and all-trans retinal.", J. Colloid Interface. Sci., 1981, 83, 2, 606-613.
- Tancrède, P., Parent, L., Leblanc, R.M., "Interactions in mixed monolayers between dioleoyl-L- α -phosphatidylcholine and 11-cis retinal. A comparison with all-trans retinal.", J. Colloid Interface. Sci., 1982, 89, 1, 117-123.
- Tancrède, P., Paquin, P., Houle, A., Leblanc, R.M., "Formation of asymmetrical planar lipid bilayer membranes from characterized monolayers.", J. Biochim. Biophys. Methods, 1983, 7, 299-310.
- Thorne, S.W., Duniec, J.T., "The physical principles of energy transduction in chloroplast thylakoid membranes.", Quart. Rev. Biophys., 1983, 16, 2, 197-278.
- Tiede, D.M., Müller, P., Dutton, P.L., "Spectrophotometric and voltage clamp characterization of monolayers of bacterial photosynthetic reaction centers.", Biochim. Biophys. Acta, 1982, 681, 191-201.
- Ti Tien, H., "Artificial planar bilayer lipid membranes.", dans Membranes and Transport, 1982, Martonosi, vol 1, Plenum Publishing Corporation, 165-171.
- Turro, N.J., dans Modern Molecular Photochemistry, 1978, The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc.
- Wang, C.B., Ti Tien, H., Lopez, J.R., Liu, Q.Y., Joshi, N.B., Hu, Q.Y., "Photo-electrochemical properties of bilayer lipid membranes containing covalently linked porphyrin-quinone and other complexes.", Photobiochem. Photobiophys., 1982, 4, 177-184.

- Wong, D., Govindjee, "Antagonistic effects of mono- and divalent cations on polarization of chlorophyll fluorescence in thylakoids and changes in excitation energy transfer.", FEBS Letters, 1979, 97, 2, 373-377.
- White, S.H., Petersen, D.C., Simon, S., Yafuso, M., "Formation of planar bilayer membranes from lipid monolayers - A critique.", Biophys. J., 1976, 16, 481-488.
- White, S.H., "Formation of "Solvent-Free" black lipid membranes from glyceryl monooleate dispersed in squalene.", Biophys. J., 1978, 23, 337-347.
- White, S.H., "The physical nature of planar bilayer membranes.", Ion Channel Reconstitution, 1986, Christopher Miller Editor, Plenum Publishing Corporation, 3-35.

Annexe: Programmes Informatiques

Programme INPUT.DATA

```

100 TEXT : HOME :CD$ = CHR$ (4): PRINT CD$"PR#3": PRINT "Wait ..."
110 DIM CO(150),XX(600),YY(150),YY$(600),ZZ(150)
120 PRINT CD$"BRUN ASOFT8BIT,D1": HOME
125 PRINT CD$"OPEN CALIB.PHOTONS.CORR.SMOOTH,D1"
130 PRINT CD$"READ CALIB.PHOTONS.CORR.SMOOTH"
135 INPUT I: FOR X = 1 TO I: INPUT CO(X): NEXT
140 PRINT CD$"CLOSE CALIB.PHOTONS.CORR.SMOOTH"
150 A$ = "+-----+": GOSUB 1000
160 A$ = "!": GOSUB 1000
170 A$ = "! Input Data Program": GOSUB 1000
180 A$ = "!": GOSUB 1000
190 A$ = "+-----+": GOSUB 1000
200 VTAB 10:A$="Le Spectra Link doit avoir terminé son balayage.":
    GOSUB1000
210 VTAB 12:A$="Le programme est fait pour un spectre allant de 650
    nm":GOSUB1000
220 A$="à 800 nm avec un point à tous les 1,0 nm. Le nombre de":GOSUB
    1000
230 A$ = "comptes doit etre < 12 777 216 ( 4 BYTES ).": GOSUB 1000
240 VTAB 20: HTAB 20: PRINT "Pour aller chercher les données: SPACE BAR"
250 VTAB 21:HTAB 20:PRINT"Pour terminer :N'IMPORTE QUOI D'AUTRE --> ";
    GET Z$
260 IF Z$ < > CHR$ (32) THEN 520
270 REM Deactivate 80 columns card
280 HOME : PRINT CHR$ (27) CHR$(17)
290 REM Apple Super Serial Card is in slot #2
300 PRINT CD$"PR#2": PRINT CD$"IN#2"
310 & CHR$ (58): CALL 930: REM Wake up interface
320 & CHR$ (01): CALL 930: REM CPU address
330 & CHR$ (77): CALL 930: REM Go to 1st data point in memory 1
340 & CHR$ (00): CALL 930: REM 0 bytes are expected
350 REM From 650 to 800 nm using 1,0 nm increment will give 150pts.
    Less then 16 777 216 cnts are expected so only 4 bytes are required.
    Since "m" read only 50 points it must be used 3 times.
360 FOR II = 1 TO 3
370 & CHR$ (109): CALL 930
380 & CHR$ (200): CALL 930
390 FOR JJ = 1 TO 200
400 & CHR$ (63): CALL 930:XX(JJ + (II - 1) * 200) = PEEK (929)
410 NEXT JJ
420 NEXT II
430 & CHR$ (58): CALL 930: REM Close interface
440 PRINT CD$"PR#0": PRINT CD$"IN#0": PRINT CD$"PR#3"

```

```

450 PRINT "Voici quelles sont les valeurs entrées :."
460 FOR II = 1 TO 600 STEP 4
470 PRINT 650 + (II + 3) / 4 " nm --> ";
480 W1=XX(II+3):W2=XX(II+2)*256:W3=XX(II+1)*256^2:W4=XX(II)*256^3
490 YY((II+3)/4)=W1+W2+W3+W4:PRINT W4+"W3"+"W2"+"W1"="YY((II+3)/4)
500 NEXT II
510 GOSUB 4000: GOSUB 3000: GOSUB 5000
520 HOME:PRINT"Voulez-vous recommencer (1) ou sortir (0)";:GET Z:PRINT
530 IF Z = 1 THEN HOME : GOTO 240
540 IF Z < > 0 THEN 520
550 PRINT CD$"RUN CHOIX,D1"
1000 REM <<<<<<<<< Centrer la variable A$ sur 80 colonnes >>>>>>>>>
1010 Z = INT (40 - ( LEN (A$) / 2)): IF Z < 1 THEN Z = 1
1020 HTAB Z: PRINT A$: RETURN
3000 REM <<<<<<<<< Imprimante >>>>>>>>>
3010 PRINT : PRINT "Imprimante (Y/N) -> ";: GET Z$: PRINT
3020 IF Z$ = "N" THEN RETURN
3030 IF Z$ < > "Y" THEN 3010
3040 PRINT CD$"PR#1"
3050 PRINT "Voici quelles sont les valeurs entrées :."
3060 FOR I=1 TO 150: PRINT "Point "I" : "650 + I" nm --> "YY(I)" comptes":
NEXT I:PRINT CD$"PR#3": RETURN
4000 REM <<<<<<<<< Correction du spectre >>>>>>>>>
4010 PRINT"Voulez-vous corriger immédiatement le spectre (Y/N)->";:GET Z$:
PRINT
4020 IF Z$ = "N" THEN RETURN
4030 IF Z$ < > "Y" THEN 4010
4080 FOR X = 1 TO 150:ZZ(X) = INT(YY(X) * CO(X)): NEXT
4090 PRINT : PRINT "Voici les résultats ": PRINT "DATA";: POKE 36,30: PRINT
"Correction factor";: POKE 36,60: PRINT "Résultat"
4100 PRINT : FOR X = 1 TO 150: PRINT YY(X);: POKE 36,30: PRINT CO(X);:
POKE 36,60: PRINT ZZ(X): NEXT
4170 PRINT : PRINT "Voulez vous conserver le spectre corrigé et": PRINT
"rejeter le non-corrigé (Y/N) --> ";: GET Z$: PRINT
4180 IF Z$ = "N" THEN RETURN
4190 IF Z$ < > "Y" THEN 4170
4200 FOR X = 1 TO 150:YY(X) = ZZ(X): NEXT : TEXT : RETURN
5000 REM <<<<<<<<< Storage on disk >>>>>>>>>
5010 PRINT:PRINT"Storage on disk Y/N";:GET Z$:PRINT:IF Z$="N" THEN
RETURN
5020 IF Z$ < > "Y" THEN 5010
5030 PRINT : INPUT "Nom du fichier --> ";Z$
5040 PRINT CD$"OPEN ";Z$;" ,D2"
5050 PRINT CD$"WRITE ";Z$
5060 J = 150: PRINT J: FOR I = 1 TO J: PRINT YY(I): NEXT I
5070 PRINT CD$"CLOSE ";Z$: RETURN

```

Programme ASOFT8BIT

0300-	A9	4C	8D	F5	03	A9	10	8D
0308-	F6	03	A9	03	8D	F7	03	60
0310-	20	6D	03	20	E3	DF	A0	00
0318-	B1	83	F0	2E	AA	C8	B1	83
0320-	85	5E	C8	B1	83	85	5F	A0
0328-	00	B1	5E	20	ED	FD	C8	CA
0330-	D0	F7	A0	00	B1	B8	C9	3A
0338-	F0	10	C9	00	F0	0C	C9	3B
0340-	F0	11	20	7D	E0	90	07	4C
0348-	10	03	20	8E	FD	60	A2	10
0350-	4C	12	D4	20	59	03	4C	60
0358-	03	E6	B8	D0	02	E6	B9	60
0360-	B1	B8	C9	3A	F0	E7	C9	00
0368-	F0	E3	4C	10	03	A0	00	B1
0370-	B8	D9	9F	03	D0	28	C8	C0
0378-	02	D0	F4	68	68	20	86	03
0380-	20	ED	FD	4C	32	03	A9	02
0388-	18	65	B8	85	B8	A9	00	65
0390-	B9	85	B9	20	67	DD	20	FB
0398-	E6	A5	A1	20	59	03	60	E7
03A0-	28	3A	A0	20	B9	89	C0	48
03A8-	29	20	4A	4A	85	35	68	29
03B0-	0F	C9	08	90	04	29	07	B0
03B8-	02	A5	35	05	35	F0	05	09
03C0-	20	9D	B8	05	90	DC	B9	88
03C8-	C0	8D	A1	03	60	38		

Programme MEMBRANE

```

100 D$ = CHR$(4):I$ = CHR$(9):ESC$ = CHR$(27): PRINT D$"PR#3"
110 TEXT : RESTORE : HOME
120 REM -----Propriétés électriques des membranes
130 DIM A(10),B(10),C(40),C1(200),C2(200),C3(200),C4(200),C5(200)
140 DIM C6(200),DI(200),RE(200),R1(200),R2(200),R3(200),R4(200)
150 DIM R5(200),R6(200),R7(200),R8(200),SU(200),TI$(200),X(25)
160 REM ----DATA RI----
170 DATA .400865832,-6.88325579E-3,-9.6264568E-5,2.2140791E-6
180 DATA -3.25163938E-8,2.86405409E-10,-1.07840231E-12
190 REM ----DATA RX----
200 DATA .212500577,-.0235996071,7.13906633E-4,-2.81846812E-5
210 DATA 4.8394276E-7,-3.80678515E-9,1.12687124E-11
220 REM ----DATA C----
230 REM ----RIfm<20----
240 DATA 0,0,0,0,0,0,0,0,0,0
250 REM ----RIfm<50----
260 DATA -107.697831,.0723569882,-1.81057731E-4,1.77998878E-7
270 DATA -7.68021168E-11,1.16385113E-14,0,0,0,0
280 REM ----RIfm<80----
290 DATA -108.276936,.065602792,-1.24863427E-4,1.17223464E-7
300 DATA -6.02593855E-11,1.12915624E-14,0,0,0,0
310 REM ----RIfm>80----
320 DATA -115.050022,.168563387,-4.40314327E-4,5.4156368E-7
330 DATA -3.41374927E-10,8.36113219E-14,0,0,0,0
340 REM -----Entrée des données
350 TEXT : HOME : RESTORE : PRINT
360 VTAB 5: PRINT "Les données doivent etre entrées comme suit : "
370 PRINT "-----"
380 VTAB 9: HTAB 10: PRINT "Le titre du travail"
390 VTAB 11: HTAB 10: PRINT "Lenombre de membranes"
400 VTAB 13: HTAB 10: PRINT "Relec RI f RX f RI f m RX f m DIAM Temps de vie"
410 VTAB 15: HTAB 40: PRINT "t:7 caract}res"
420 VTAB 17: HTAB 10: PRINT "Calibration du 9/12/85"
430 VTAB 22:HTAB15:PRINT"La diskette de données doit etre dans DRIVE 2"
440 HTAB 15:PRINT "----- programme ----- DRIVE 1"
450 VTAB 20:HTAB 15:INPUT"Dans quel fichier se situent les données?";F$
460 PRINT D$"OPEN "F$",D2": PRINT D$"READ "F$: INPUT I: INPUT T$:
  INPUT N
470 FOR I = 1 TO N: INPUT RE(I),R1(I),R5(I),R3(I),R7(I),DI(I),TI$(I): NEXT I
480 PRINT D$"CLOSE "F$
490 REM -----Corrections
500 H = 7: FOR I = 1 TO H: READ A(I): NEXT I: REM ----RI----
510 G = 7: FOR I = 1 TO G: READ B(I): NEXT I: REM ----RX----
520 CS = 1492: REM ----Cs----
530 FOR I = 1 TO 40: READ C(I): NEXT I: REM ----C----
540 REM -----Calculs
550 CA = 0: FOR I = 1 TO N

```



```

555 VTAB 2: POKE 36,70: PRINT N - I"...
560 :R2(I) = R1(I):R4(I) = R3(I):R6(I) = R5(I):R8(I) = R7(I)
570 : FOR K = 1 TO H
580 ::R2(I) = R2(I) + A(K) * R1(I) ^ (K - 1)
590 ::R4(I) = R4(I) + A(K) * R3(I) ^ (K - 1)
600 : NEXT K
610 : FOR K = 1 TO G
620 ::R6(I) = R6(I) + B(K) * R5(I) ^ (K - 1)
630 ::R8(I) = R8(I) + B(K) * R7(I) ^ (K - 1)
640 : NEXT K
650 :C1(I) = R6(I) * CS / (RE(I) + R2(I))
660 :C3(I) = R8(I) * CS / (RE(I) + R4(I))
670 :C2(I) = C1(I):C4(I) = C3(I):L = 31
680 :: IF R3(I) < 80 THEN L = 21
690 :: IF R3(I) < 50 THEN L = 11
700 :: IF R3(I) < 20 THEN L = 1
710 : FOR K = L TO L + 9
720 ::C2(I) = C2(I) + C(K) * C1(I) ^ (K - L)
730 ::C4(I) = C4(I) + C(K) * C3(I) ^ (K - L)
740 : NEXT K
750 :C5(I) = C4(I) - C2(I):SU(I) = 3.14159265359 * DI(I) ^ 2 / 4
760 :C6(I) = C5(I) * 10 ^ 5 / SU(I):CA = CA + C6(I)
770 NEXT I
780 REM -----Statistiques
790 S1 = 0:S2 = 0:S3 = 0:S4 = 0:MO = CA / N
800 FOR I = 1 TO N
810 :S1 = S1 + ABS (C6(I) - MO):S2 = S2 + (C6(I) - MO) ^ 2
820 :S3 = S3 + (C6(I) - MO) ^ 3:S4 = S4 + (C6(I) - MO) ^ 4
830 :FOR Z = 980 TO 540 STEP - 20
840 ::IF C6(I) < Z THEN GOTO 860
850 ::X((Z - 520) / 20) = X((Z - 520) / 20) + 2: GOTO 870
860 : NEXT Z
870 NEXT I
880 ME = S1 / N:EC = SQR (S2 / (N - 1)):CV = EC / MO
890 AS = S3 / (N * EC ^ 3):AP = S4 / (N * EC ^ 4)
900 REM -----Output
910 HOME : VTAB 3: HTAB 5: PRINT T$
920 VTAB 4: HTAB 5: FOR I = 1 TO LEN (T$): PRINT "-";: NEXT I
930 VTAB 10: HTAB 10: PRINT "Statistiques :"
940 VTAB 11: HTAB 10: PRINT "-----"
950 VTAB 14: HTAB 20: PRINT "Nombre de membranes : ";N
960 HTAB 9: PRINT "Capacitance spécifique moyenne : ";MO
970 HTAB 29: PRINT "Ecart-type : ";EC
980 HTAB 22: PRINT "Déviation moyenne : ";ME
990 HTAB 15: PRINT "Coefficient de variation : ";CV
1000 HTAB 16: PRINT "Coefficient d'asymétrie : ";AS
1010 HTAB 12: PRINT "Coefficient d'aplatissement : ";AP
1020 VTAB 23:HTAB 20:PRINT"Voulez-vous les résultats sur l'imprimante O/N ";
GET A$: PRINT

```

```

1030 IF A$ = "O" THEN GOTO 1190
1040 IF A$ < > "N" THEN GOTO 1020
1050 TEXT:HOME:VTAB 12:PRINT"Voulez-vous voir l'histogramme O/N ";GET
A$: PRINT
1060 IF A$ = "O" THEN GOTO 1580
1070 IF A$ = "N" THEN GOTO 1130
1080 GOTO 1050
1090 VTAB 24: PRINT "Voulez-vous l'histogramme sur l'imprimante O/N "; GET
A$: PRINT
1100 IF A$ = "O" GOTO 1780
1110 IF AA = 18 THEN 1850
1120 IF A$ < > "N" THEN GOTO 1090
1130 TEXT : HOME : VTAB 12: PRINT "Voulez-vous : 1. Sortir"
1140 PRINT "          2. Recommencer un autre syst}me"
1150 PRINT : PRINT : PRINT "----> ";: GET A$: PRINT
1160 IF A$ = "1" THEN GOTO 1840
1170 IF A$ = "2" THEN GOTO 340
1180 GOTO 1130
1190 REM -----Impression sur l'imprimante EPSON FX-80
1200 REM -----à l'aide de l'interface PKASO rev U1.0
1210 PRINT DS"PR#1": PRINT ESC$"@" : PRINT : PRINT : PRINT
1220 PRINT ESC$"4";ESC$"1";TS: PRINT ESC$"5";ESC$"0";
1230 B$ = *****
1240 C$ = **      *      *      *      *      *      *      **
1250 PRINT : PRINT : PRINT ESC$"A" CHR$ (10);: REM Line spacing
1260 PRINT B$;B$: PRINT C$
1270 PRINT "  Durée  * R elec * C fm * C f  ";
1280 PRINT "  C m   * C sp * Surface "
1290 PRINT "  (min) * (kohm) * (pF) * (pF)  ";
1300 PRINT "  (pF) *(nF/cm.cm)*(micron^2)"
1310 PRINT C$: PRINT B$;B$: PRINT C$
1320 FOR I = 1 TO N
1330 :RE(I) = INT (100 * RE(I)) / 100:C4(I) = INT (100 * C4(I)) / 100
1340 :C2(I) = INT (100 * C2(I)) / 100:C5(I) = INT (100 * C5(I)) / 100
1350 :C6(I) = INT (10 * C6(I)) / 10:SU(I) = INT (SU(I))
1360 :PRINT " ";I$;"3T";TI$(I);I$;"11T";"";I$;"15T";RE(I);I$;"22T";
1370 :PRINT " ";I$;"25T";C4(I);I$;"33T";"";I$;"36T";C2(I);I$;"44T";
1380 :PRINT " ";I$;"47T";C5(I);I$;"55T";"";I$;"59T";C6(I);I$;"66T";
1390 :PRINT " ";I$;"70T";SU(I);I$;"77T";""
1400 NEXT I
1410 PRINT C$: PRINT B$;B$: PRINT : PRINT : PRINT
1420 PRINT CHR$ (14);: PRINT "Statistiques": PRINT : PRINT
1430 MO = INT (MO * 10) / 10:EC = INT (EC * 10) / 10:ME = INT (ME * 10) / 10
1440 CV= INT (CV*10000)/100:AS=INT (AS*1000/1000:AP=INT (AP*100)/100
1450 PRINT I$;"20T";"Nombre de membranes : ";N
1460 PRINT I$;"9T";"Capacitancespécifique moyenne : ";MO;
1470 PRINT " nF.cm";ESC$"S0";"-2";ESC$"T"
1480 PRINT I$;"29T";"Ecart-type : ";EC;
1490 PRINT " nF.cm";ESC$"S0";"-2";ESC$"T"

```

```

1500 PRINT I$;"22T";"Déviation moyenne : ";ME;
1510 PRINT " nF.cm";ESC$"S0";"-2";ESC$"T"
1520 PRINT I$;"15T";"Coefficient de variation : ";CV;" %"
1530 PRINT I$;"16T";"Coefficient d'asymétrie : ";AS
1540 PRINT I$;"12T";"Coefficient d'aplatissement : ";AP
1550 PRINT CHR$(12)
1560 PRINT D$"PR#3"
1570 GOTO 1050
1580 REM -----Histogramme sur l'écran
1590 GR : HOME
1600 FOR I = 1 TO 15: COLOR= I: VLIN 34,38 AT 2 * I + 5: NEXT I
1610 VTAB21:HTAB17:PRINT"1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15"
1620 VTAB 23: INPUT "De quelle couleur sera le cadre ? ";X1
1630 X1 = INT (X1): IF X1 < 1 OR X1 > 15 THEN GOTO 1620
1640 VTAB 23:INPUT"De quelle couleur seront les barres de l'histogramme?";X2
1650 X2 = INT (X2): IF X2 < 1 OR X2 > 15 THEN GOTO 1640
1660 COLOR= 0: FOR I = 34 TO 39: HLIN 0,39 AT I: NEXT I: HOME
1670 VTAB 23
1680 FOR I = 1 TO 23
1690 :IF X(I) > 36 THEN COLOR=X1: VLIN 1,36 AT I + 8: GOTO 1710
1700 :COLOR= X2: VLIN 37 - X(I),37 AT I + 8
1710 NEXT I
1720 COLOR=X1:HLIN 8,32 AT 0:VLIN 0,37 AT 32:HLIN 32,8 AT 37:VLIN 37,0
    AT 8
1730 FOR I = 1 TO 23 STEP 2: PLOT I + 8,38: NEXT I
1740 FOR I = 1 TO 37 STEP 2: PLOT 7,I: PLOT 33,I: NEXT I
1750 VTAB 21: HTAB 22: PRINT"! ! ! ! ! ! ! !"
1760 VTAB 22:HTAB 21:PRINT"560 620 680 740 800 860 920 980"
1770 AA = 18: GOTO 1090
1780 HOME : REM -----DUMP
1790 VTAB 21: PRINT "Nombre de membranes (0-";AA;" ) vs capacitance
    spécifique (540-1000)"
1800 PRINT D$"PR#1"
1810 PRINT I$;"38D"
1820 PRINT D$"PR#3": IF AA = 18 THEN GOTO 1850
1830 GOTO 1130
1840 TEXT : HOME : PRINT D$"RUN CHOIX,D1"
1850 GR : HOME : REM -----HISTOGRAMME SUR L'ECRAN II
1860 VTAB 23: FOR I = 1 TO 23
1880 X(I) = X(I) * 2
1890 :IF X(I) > 36 THEN COLOR=X1: VLIN 1,36 AT I + 8: GOTO 1910
1900 :COLOR= X2: VLIN 37 - X(I),37 AT I + 8
1910 NEXT I : COLOR= X1:HLIN 8,32 AT 0:VLIN 0,37 AT 32:HLIN 32,8 AT 37 :
    VLIN 37,0 AT 8
1930 FOR I = 1 TO 23 STEP 2: PLOT I + 8,38: NEXT I
1940 FOR I = 1 TO 37 STEP 4: PLOT 7,I: PLOT 33,I: NEXT I
1950 VTAB 21: HTAB 22: PRINT"! ! ! ! ! ! ! !"
1960 VTAB 22:HTAB 21:PRINT"560 620 680 740 800 860 920 980"
1970 AA = 9: GOTO 1090

```